

# **Untersuchung zur Wirkung von Boswelliasäuren auf die Überlebenszeit von Ratten mit C6-Gliomen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von  
Afshin Rahmanian-Schwarz**

**Gießen 2006**

**Aus dem Medizinischen Zentrum  
für Neurologie und Neurochirurgie  
Neurochirurgische Klinik  
Leiter: Prof. Dr. Dieter-Karsten Böker  
des Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Gutachter: Prof. Dr. M. Winking  
Gutachter: Prof. Dr. T. Traupe**

*Meiner Frau gewidmet*

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b><u>1. EINLEITUNG .....</u></b>	<b><u>4</u></b>
<b>1.1 GLIOME.....</b>	<b>4</b>
1.1.1 GESCHICHTLICHER ÜBERBLICK.....	4
1.1.2 Bedeutung der Gliome .....	7
1.1.3 Klassifikation .....	7
1.1.4 Astrozytäre Gliome.....	9
1.1.4.1 Diffuses Astrozytom .....	9
1.1.4.2 Anaplastisches Astrozytom .....	10
1.1.4.3 Glioblastom (WHO-Grad IV).....	11
1.1.5 Diagnostik.....	13
1.1.6 Prognose .....	16
1.1.7 Therapie .....	17
1.2 WEIHRAUCH .....	19
1.2.1 Geschichtlicher Überblick.....	19
1.2.2 Die Botanik des Weihrauchs .....	20
1.2.3 Die Weihrauchernte.....	21
1.3 BOSWELLIASÄUREN.....	24
1.3.1 BOSWELLIASÄUREN - SAURE BESTANDTEILE DES WEIHRAUCHHARZES.....	24
1.3.2.1 5-Lipoxygenase .....	27
1.3.2.2 Boswelliasäuren .....	28
1.3.4 H15 (Äthanolisches Extrakt der Boswelliasäure) .....	31
1.3.5 Nebenwirkungen .....	31
1.4 BIOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE ASPEKTE .....	32
1.4.1 Leukotriene.....	32
1.4.1.1 Eicosanoide und Arachidonsäuren.....	32
1.4.1.2 Leukotriene Allgemein.....	34
1.4.1.3 Cysteinyl- Leukotriene im zentralen Nervensystem .....	36

1.4.1.4 Cysteinyl-Leukotriene im Hirntumorgewebe.....	37
1.4.2 Topoisomerasen.....	39
1.4.2.1 Allgemeines.....	39
1.4.2.2 Biologische Funktion der Topoisomerasen .....	42
1.4.2.3 Topoisomeraseinhibitoren .....	43
<b><u>2. PROBLEMSTELLUNG.....</u></b>	<b>45</b>
<b><u>3. MATERIAL UND METHODEN .....</u></b>	<b>47</b>
3.1 C6 – TUMORZELLKULTUREN.....	47
3.2 INSTRUMENTE.....	49
3.3 IMPLANTATIONSTECHNIK.....	50
3.4 APPLIKATION H15-EXTRAKT.....	52
3.5 VERSUCHSTIERE.....	53
3.6 VITALITÄTSANALYSE UND KLINISCHER STATUS .....	54
3.6.1 Datenanalyse und Auswertung .....	56
3.7 ENTNAHME DES GEHIRNS ZUM TUMORNACHWEIS.....	57
<b><u>4. ERGEBNISSE .....</u></b>	<b>58</b>
4.1 VITALITÄTSINDEX .....	58
4.1.1 Vitalitätsindex vor Implantation.....	58
4.1.2 Vitalität 7 Tage nach Implantation bis 7 Tage nach Behandlungsbeginn.....	59
4.1.3 Vergleich der Vitalität ab dem 7. Tag nach Behandlungsbeginn.....	60
4.2 EVALUATION UND VERGLEICH DES KÖRPERGEWICHTES.....	64
4.3 EVALUATION UND VERGLEICH DER ÜBERLEBENSZEIT.....	66
4.4 NACHWEIS TUMORWACHSTUM (MAKROSKOPISCHER BEFUND) .....	69
4.5 BEOBACHTETE NEBENWIRKUNGEN .....	70

---

<b><u>5. DISKUSSION.....</u></b>	<b><u>71</u></b>
5.1 PROBLEME IN DER BEHANDLUNG DER GLIOBLASTOME.....	72
5.1.1 Blut- Hirn- Schranke als Barriere.....	75
5.2 WIRKUNG DER BOSWELLIASÄUREN AUF DIE LEUKOTRIENSYNTHESE .....	76
5.3. WIRKUNG DER BOSWELLIASÄUREN AUF TOPOISOMERASEN...	79
5.4 KLINISCHE RELEVANZ UND AUSSICHTEN .....	81
 <b><u>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</u></b>	<b><u>84</u></b>
SUMMARY .....	86
 <b>A. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>88</b>
<b>B. TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>89</b>
<b>C. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>90</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Gliome

### 1.1.1 Geschichtlicher Überblick

Die Entfernung eines raumfordernden intracerebralen Prozesses im Sinne eines Glioms erfolgte erstmalig 1885 von BENNET und GODLEE. Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieb RUDOLF VIRCHOW die Neuroglia als Ursprung von Tumoren und trennte die Gliome von den Psammomen, den Melanomen und anderen Sarkomen des Nervensystems (Virchow 1864/65).

1914 erklärte RIBBERT eine Störung des Entdifferenzierungs- und Reifungsprozesses der glialen Vorläuferzellen während der Ontogenese als mögliche Ursache für die Gliomentstehung.

Eine Differenzierung der neurogliösen Zellen nach zwei Typen machte CAJAL (1913) durch seine Goldfärbung. Er differenzierte Zellen mit positiver und negativer Färbung. Während er die positiv reagierenden Zellen nach Astrozyten mit langen und kurzen Fortsätzen unterteilte, machte später HOREGA (1919) eine Unterteilung der negativ reagierenden Zellen in oligodendrogliale und mikrogliale Zellen.

Die Studien von BAILEY und CUSHING führten 1926 zu einer Weiterentwicklung der Hirntumoreinteilung. Hier erfolgte erstmalig eine systematische Subklassifizierung der Hirntumoren anhand eines histologischen Schemas. Als Vorläuferzellen der Oligodendroglia und der Oligodendrogliome sahen sie die Meduloblasten, beschrieben jedoch keine Zwischenstufen in der Differenzierung dieser zu Oligodendroglia und keine malignen Formen der Oligodendrogliome.

Ein weiteres Klassifikationsschemata, daß eine weite Verbreitung erfuhr wurde 1949 von KERNIHAN et al. beschrieben und basierte auf der neoplastischen Proliferation und Enddifferenzierung der Tumorzellen.

**Tab.1: Klassifikationsschemata KERNOHAN et al. 1949**

<b>Astrozytom</b>	<b>Grad I-IV</b>
<b>Ependymom</b>	<b>Grad I-IV</b>
<b>Oligodenroglom</b>	<b>Grad I-IV</b>
<b>Neuroastrocytom</b>	<b>Grad I-IV</b>
<b>Medulloblastom</b>	

Hier erfolgte die Differenzierung in Grad I mit geringem Unterschied zum normalen Gliagewebe, Grad II mit zellreicheren Gliomen, Grad III und IV mit anaplastischen Gliomen. Trotz der großen Anerkennung dieser viergradigen Einteilung der Hirntumoren von KERNOHAN war ZÜLCH der Auffassung, dass neben der Malignität auch die Embryogenese und Herkunft eines Hirntumors in der Klassifikation berücksichtigt werden müsste (Zülch 1980).

1980 publizierte ZÜLCH seine eigene Hirntumorklassifikation mit dem Ziel, sowohl die histologischen Merkmale als auch den Malignitätsgrad dieser Tumoren zu erfassen. Als Grundlage dieser Einteilung, welche Basis der Hirntumorklassifikation der World Health Organisation (WHO) wurde, dienen neben der zytologischen, histoarchitektonischen und topographischen Merkmalen auch das Ursprungsgewebe der Tumorzellen.

Die WHO-Klassifikation wurde inzwischen zweimal, 1993 von KLEIHUES et al. und 2000 von KLEIHUES u. CAVANEE, grundlegend überarbeitet.



**Tab.2: WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems***- neuroepitheliale Tumoren / Gliome (KLEIHUES u. CAVENEE 2000)*

## WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems (*neuroepitheliale Tumoren*)

### Gliome

*KLEIHUES u. CAVENEE 2000*

#### astrozytäre Tumoren

- diffuses Astrozytom (Varianten:  
fibrilläres Astrozytom,  
protoplasmatisches Astrozytom,  
gemistozytäres Astrozytom)
- anaplastisches Astrozytom
- Glioblastom (Varianten: Riesenzellglioblastom, Gliosarkom)
- pilozytisches Astrozytom
- pleomorphes Xanthoastrozytom
- subependymales Riesenzellastrzytom (tuberose Sklerose)

#### oligodendrogliale Tumoren

- Oligodendrogliom
- anaplastisches Oligodendrogliom

#### Mischgliome

- Oligoastrozytom
- anaplastisches Oligoastrozytom

#### ependymale Tumoren

- Ependymom (Varianten: zelluläres Ependymom,  
papilläres Ependymom, klarzelliges Ependymom,  
tanyzytisches Ependymom)
- anaplastisches Ependymom
- myxopapilläres Ependymom
- Subependymom

#### Tumoren des Plexus choroideus

- Plexuspapillom
- Plexuskarzinom

#### gliale Tumoren unklaren Ursprungs

- Astroblastom
- Gliomatosis cerebri
- chordoides Gliom des III. Ventrikels

### 1.1.2 Bedeutung der Gliome

Die größte Gruppe hirneigener Neoplasien wird durch Tumoren mit neuroepitheliale Ursprung, zu dem auch die Gliome gehören, gebildet. Gliome machen ca. 45-55% der intrakranialen Tumoren aus (Zülch 1986, Russel u. Rubinstein 1989). Neben astrozytären Tumoren einschließlich der Glioblastome gehören ependymale und oligodendrogiale Tumoren zu den Gliomen.

In den westlichen Industrienationen ist seit Anfang der 60er-Jahre, unabhängig vom zunehmenden Lebensalter der Bevölkerung, ein nachweisbarer Anstieg der Inzidenz von intrakranialen Tumoren und besonders von Gliomen zu verzeichnen (Mahaley 1991, Riggs 1991). Eine kurative Therapie der malignen Gliome ist bis heute nicht möglich, auch die palliativen Therapieergebnisse sind noch unbefriedigend. Daher sind diese Tumoren in den letzten 30 Jahren Gegenstand intensiver klinischer und wissenschaftlicher Untersuchungen gewesen.

### 1.1.3 Klassifikation

Als Grundlage der histologischen Zuordnung der Gliome dient zurzeit die revidierte Fassung des WHO-Klassifikationsschemas von 2000 (Kleihues u. Cavanee 2000).

Bei der Differenzierung liegt hier eine Anlehnung an die Arbeit von BURGER et al. 1985 vor. Er trennte die niedriggradig malignen Astrozytome, die anaplastischen Astrozytome und die Glioblastome voneinander. Das entscheidende Kriterium zur Trennung zwischen anaplastischen Astrozytomen und Glioblastomen war das Vorhandensein von Nekrosen, welche histologisch das Glioblastom definieren. Im aktuellen Klassifikationsschema der WHO (Kleihues u. Cavanee 2000) wird diese Differenzierung verwendet.

- Die WHO-Klassifikation unterscheidet 4 astrozytäre Tumorggrade:

- Das Astrozytom Grad I entspricht dem pilozytischen Astrozytom des Kindes- und jungen Erwachsenenalters
- Astrozytome des WHO-Grades II sind differenzierte, astrozytäre Tumoren mit niedrigem Proliferationspotenzial und histologisch ohne Malignitätskriterien
- Anaplastische Astrozytome stellen die Astrozytome WHO-Grad III dar, welche sich durch histologische Malignitätskriterien wie Mitosenreichtum, Zell- und Kernpolymorphien, ausgeprägte Neovaskularisation und durch ein hohes Proliferationspotential auszeichnen
- Astrozytäre WHO-Grad-IV-Gliome sind die Glioblastome, welche die Malignitätskriterien der WHO-Grad-III-Astrozytome besitzen und zusätzlich Nekrosen aufweisen, zum Teil verbunden mit intratumoralen Blutungen (Kleihues et al. 2000)

Grundsätzlich liegt allen Klassifikationssystemen ein histogenetisches Einteilungsprinzip zugrunde und sie dienen der Übersichtlichkeit. Zurzeit hat die WHO-Klassifikation der Tumoren des Nervensystems im deutschsprachigen Raum aber auch international die weiteste Verbreitung. Bei der letzten Überarbeitung im Jahre 2000 (Kleihues u. Cavanee 2000) wurden erstmals auch Befunde aus der molekularen Neuropathologie und aus der molekularen Genetik in die Klassifikation mit einbezogen.

### 1.1.4 Astrozytäre Gliome

Astrozytäre Gliome unterschiedlicher Morphologie sind mit einem Anteil von über 60 % der häufigste Vertreter der Gliome und können grob in 2 Gruppen unterteilt werden. Zu der ersten Gruppe gehören diffus infiltrierend wachsende astrozytäre Tumoren wie das diffuse Astrozytom, das anaplastische Astrozytom und Glioblastom.

Die zweite Gruppe, die vorwiegend bei Kindern und jungen Erwachsenen auftritt, sind die astrozytären Tumoren, die in der Regel ein besser abgegrenztes Wachstum gegenüber dem Hirngewebe aufweisen. Hierzu gehören das pilozytische Astrozytom, das pleomorphe Xanthoastrozytom und das subependymale Risenzellastrozytom. Wegen eines langsamen Wachstums und einer vergleichsweise geringen Tendenz zur malignen Progression ist hier nach einer vollständigen Tumorentfernung eine dauerhafte Heilung möglich.

Im Gegensatz dazu haben die diffusen Astrozytome durch ihre Neigung zur Rezidivbildung und spontanen malignen Progression eine deutlich schlechtere Prognose.

#### 1.1.4.1 Diffuses Astrozytom

Die diffusen Astrozytome können prinzipiell in allen Altersgruppen vorkommen, treten aber vorwiegend im jungen bis mittleren Erwachsenenalter auf. Sie machen bis zur 5% der hirneigenen Tumoren und 10-15% der astrozytären Gliome aus. Die häufigste Lokalisation dieser Tumoren sind die Großhirnhemisphären. Auf der Schnittfläche findet sich häufig neben den zystischen Arealen eine grau-weißlich gefärbte diffuse Gewebeaufreibung.

Mikroskopisch ist ein mäßig zellreiches, gut differenziertes astrozytäres Gliom erkennbar. Histologisch können neben fibrillär, gemistozytische und protoplasmatische Form auftreten.

Die diffusen Astrozytome werden nach der WHO-Klassifikation in den WHO-Grad II eingestuft und neigen zur malignen Entartung.

Bei der Entwicklung der diffusen zu den anaplastischen Astrozytomen (WHO-Grad III) kommt es zu einer erhöhten zellulären und nukleären Pleomorphie, sowie Zunahme der Zelldichte und erhöhter Mitoseaktivität.

#### **1.1.4.2 Anaplastisches Astrozytom**

Die Entstehung anaplastischer Astrozytome ist entweder aus einem vorbestehenden diffusen WHO-Grad II-Astrozytom oder de novo möglich. Neben einem Altersgipfel zwischen dem 35. bis 45. Lebensjahr ist hier ein weiterer Altersgipfel im Kindesalter zu beobachten. Das Auftreten dieser Tumorgruppe ist ähnlich häufig wie die o.gen. diffusen Astrozytome des WHO-Grad II.

Während bei Erwachsenen die Großhirnhemisphären bevorzugt betroffen sind, kommt es bei Kindern auch zum Befall des Hirnstamms. Auf der Schnittfläche finden sich häufig Zeichen einer Raumforderung mit perifokalem Ödem. Eine makroskopische Differenzierung zu diffusen Astrozytomen des WHO-Grad II ist oft nicht möglich.

Histologisch können anaplastische Astrozytome als fibrilläre, gemistozytische oder kleinzellige Form auftreten. Hier findet sich im Vergleich zu den diffusen WHO-Grad-II-Astrozytomen eine erhöhte Zelldichte, sowie eine verstärkte nukleäre und zelluläre Polymorphie. Die erhöhte mitotische Aktivität dient hier als Hauptkriterium zur Abgrenzung gegenüber einem diffusen WHO-Grad-II-Astrozytom. Sie werden in den WHO-Grad III eingestuft. Im Vergleich zu Glioblastomen (WHO-Grad IV) mit typischer girlanden- und glomerulumartigen Kapillarproliferation finden sich hier nur beginnende mikrovaskuläre Proliferate und auch keine Tumorgewebsnekrosen (Schlegel/ Weller/ Westphal1998).

### 1.1.4.3 Glioblastom (WHO-Grad IV)

Als häufigstes astrozytäres Gliom haben die Glioblastome eine Inzidenz von 2-3 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Sie bilden ca. 50% der Gliome des Erwachsenenalters. Laut amerikanischen Datenbanken sind 22,6% der primären Hirntumoren Glioblastome. Neben einer auffälligen Geschlechtsprädisposition für das männliche Geschlecht kann dieser Tumor in jeder Altersgruppe auftreten, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 62 Jahren liegt. Auch bei einigen hereditären Tumorsyndromen wie u.a. beim Li-Fraumeni-Syndrom mit Vorliegen einer Keimbahnmutation von p53 und beim Turcot- Syndrom (Typ II) mit einer durch Mutation gestörten DNA-Reparatur-Fähigkeit, können Glioblastome vorkommen (Posner 1993, Mahaley et al. 1989).

Das Glioblastom wird in den WHO-Grad IV eingestuft. Ausschlaggebend für diese Graduierung und beweisend für die Diagnose ist das Auftreten von pathologischen mikrovaskulären Proliferaten oder Tumorgewebsnekrosen in einem diffusen astrozytären Tumor. In der aktuellen WHO-Klassifikation werden das Gliosarkom und das Riesenzellglioblastom als histologische Varianten des Glioblastom definiert. Neben einer primären Manifestation treten Glioblastome auch als Rezidive von diffusen WHO-Grad-II- und anaplastischen WHO-Grad-III-Astrozytomen im Rahmen der malignen Progression glialer Tumoren auf.

Ein pleomorphes Zellbild, Kernatypien, Gefäßproliferationen und Nekrosen charakterisieren das histologische Bild. Durch das Auftreten von vitalem Tumorgewebe neben Nekrosen, Einblutungen, zystischen und narbigen Veränderungen erscheint die Schnittfläche makroskopisch häufig sehr bunt. Vorwiegend kommen Glioblastome in der Konvexität der Großhirnhemisphären vor und zu einem geringeren Anteil in tiefen Mittellinienstrukturen. Das sog. Schmetterlingsglioblastom entsteht bei bifrontaler Lokalisation mit Wachstum über das Corpus callosum. Ein

perifokales Ödem mit Massenverschiebung ist bei diesen Tumoren häufig zu beobachten (Schlegel/ Weller/ Westphal1998).

Bei der Abgrenzung verschiedener Glioblastomformen können neben histologischen Kriterien auch Tumorentwicklung und Tumormanifestation verwendet werden. Darauf basiert besonders die Unterscheidung zwischen primären und sekundären Glioblastomen. Die häufigeren primären oder De-novo-Glioblastome treten ohne Nachweis eines vorbestehenden, besser differenzierten Glioms im höherem Alter auf, während die sekundären Glioblastome (ca. 5-10%) sich aus einem vorbekannten oder voroperierten Astrozytom oder Oligoastrozytom des WHO-Grad II oder III entwickeln.

Patienten mit malignen Gliomen präsentieren sich meist mit progredienten neurologischen Defiziten. Typischerweise sind dies fokalneurologische Ausfälle oder Persönlichkeitsveränderungen entsprechend der Lokalisation des Tumors im Gehirn. Bei Läsionen in der linken Hemisphäre überwiegen Einschränkungen der Sprache inklusive des sprachlichen Erinnerungs- und Schlußfolgerungsvermögens sowie der rechtsseitigen Kraft und Geschicklichkeit. Bei Läsionen in der rechten Hemisphäre treten vor allem Defizite der visuellen Wahrnehmung, der linksseitigen Aufmerksamkeit sowie der linksseitigen Kraft auf. Frontale Tumoren beeinflussen die exekutiven Funktionen. (Gilbert et al. 2000). Epileptische Anfälle sind in 20-40% der Fälle eines der ersten Symptome (Moots et al. 1995). Unspezifischer Kopfschmerz und Hirndruckzeichen sind ebenfalls häufig (Matkovic et al. 1984). Die klinischen Symptome können sich aufgrund von Tumorblutungen auch sehr plötzlich mit massiven Defiziten manifestieren.

## **Infiltratives Wachstum**

Die Ausbreitung von Glioblastomen erfolgt zunächst durch die Anheftung von Tumorzellen an anliegende Strukturen. Im Weiteren wird die umliegende extrazelluläre Matrix so moduliert, daß es die Migration der Tumorzellen ermöglicht. Eine wichtige Rolle in diesem Prozeß spielt die Sekretion verschiedener Proteasen, insbesondere von Metalloproteasen, welche mit ihrer lysierenden Wirkung auf umgebende Zellen und extrazelluläre Proteine als einer der Mediatoren der invasiven Qualität maligner Gliazellen identifiziert worden sind. Die Tumorzellen sind zusätzlich in der Lage, Inhibitoren dieser Proteasen zu sekretieren, wodurch sie eine Umgebung erzeugen, in der Wachstum und Stasis von ihnen kontrolliert werden (Uhm et al. 1997). Malignen Gliome entwickeln außerdem die Fähigkeit, Blutgefäße zur Proliferation anzuregen. Anhand von in vivo-Studien an Nacktmäusen konnte gezeigt werden, daß die Tumorzellen ein massives und irreguläres Gefäßwachstum induzieren, das den Bedarf der Tumorzellen an pO<sub>2</sub> und Nährstoffen zunächst deckt, bei zunehmendem Wachstum aber überfordert ist und dadurch die zentralen Nekrosen verursacht (Vajkoczy et al. 1998). Mediatoren dieses Prozesses sind unter anderen der VEGF (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Nagashima et al. 1999).

### **1.1.5 Diagnostik**

Für eine sinnvolle und adäquate Therapieplanung in der Behandlung von astrozytären Gliomen ist eine aussagekräftige Diagnostik entscheidend. Zurzeit kann eine diagnostische Zuordnung der meisten Tumoren des Nervensystems durch eine bildgebende Diagnostik mit hoher Voraussagekraft erfolgen (Gundersen et al. 1998).

Durch die invasiven Untersuchungstechniken, wie Pneumocephalographie, Ventrikulographie, Angiographie und Szintigraphie war es in der Vergangenheit nicht möglich, genaue Lokalisationsdiagnostik und



Ausmaß des Tumorwachstums durchzuführen. Erst durch die Einführung der Craniellen Computertomographie (CCT) im Jahre 1973 durch HOUNSFIELD war es erstmalig möglich den raumfordernden Prozess in seiner intrakraniellen Ausdehnung direkt darzustellen. Die Einführung der Magnetresonanztomographie 1980 (Lauterbur 1980) ermöglichte eine differenziertere Darstellung der anatomischen Strukturen als dies bei der Computertomographie möglich war.

Die Positronenemissionstomographie PET bietet als weitere diagnostische Methode eine mehrdimensionale Darstellbarkeit, welche eine quantitative Lokalisierung physiologischer und molekularer Stoffwechselprozesse erlaubt (Herholz et al. 1990, Gambhir et al. 2000). Hierbei werden Radiopharmaka in sehr geringen Dosen in den Stoffwechsel eingeschleust. Durch eine sehr hohe Sensitivität im Vergleich zur CCT und MRT ist eine direkte spezifische Aussage über die Durchblutung, den Sauerstoffverbrauch, die Expression zellulärer Enzyme sowie der Aktivität von Membrantransporten möglich.

Eine große Bedeutung der Positronen-Emissionstomographie (PET) liegt in der Rezidivdiagnostik. Hier kann im Einzelfall differenzialdiagnostisch eine Abgrenzung zwischen Strahlennekrose und aktivem Tumorrezidiv gelingen (Thiel et al. 2000).

Als weitere diagnostische Methode kann die single photon emission computed tomography (SPECT), welche die Perfusion misst und abbildet, eingesetzt werden.

Zu anderen diagnostischen Maßnahmen zählt neben elektrophysiologischen Verfahren und Liquordiagnostik, die stereotaktische Biopsie. Diese Methode wurde 1947 von SPIEGEL und WYCIS eingeführt und fand seit der Publikation von CONWAY 1973 eine breitere Akzeptanz (Conway 1973). Bestehen im Rahmen der Primärdiagnostik von intrazerebralen Befunden ein oder mehrere plausible Verdachtsdiagnosen, die mit weniger invasiven Methoden nicht bestätigt werden können, ist die Indikation einer bildgestützten, computerassistierten stereotaktischen Biopsie gegeben (Thiel et al. 2000).

Welche diagnostischen Verfahren zum Einsatz kommen hängt von der klinischen Notwendigkeit, Dringlichkeit, Verfügbarkeit der Verfahren und anderen Faktoren ab. Immer mehr sind native Röntgenuntersuchungen und invasive Untersuchungsverfahren in ihrer Bedeutung für die Diagnostik von Hirntumoren in den Hintergrund getreten.

Die Diagnostik der Gliome erfolgt aus einer möglichst umfassenden Bildgebung mit CCT und MRT. Diese Untersuchungen basieren hauptsächlich auf der Densität bzw. Signalintensität von Tumorgewebe, sowie auf einem Kontrastenhancement und auf indirekten Zeichen, wie Raumforderung und Massenverschiebung (Hatanaka et al. 1984).

Die anaplastischen Astrozytome zeigen im Gegensatz zur den WHO-Grad-II-Astrozytomen im CT und MRT häufiger ein perifokales Ödem und heterogene Kontrastmittelaufnahmen (Scott et al. 2002).

Bei den Glioblastomen zeigt sich im CT eine oft ringförmig, kontrastmittelangereicherte Läsion mit hypodensem Zentrum (Nekrose) und ausgeprägtem perifokalem Ödem. Das T1-gewichtete MRT-Bild zeigt eine signalhyperintense, heterogen Gadolinium aufnehmende Läsion mit ausgedehntem Ödem im T2-gewichteten Bild.

### 1.1.6 Prognose

Die Prognose und der Verlauf von intrakraniellen Tumoren ist für die einzelnen Patienten sehr variabel, denn sie richten sich nach der Histologie, der Lage des Tumors und der Wachstumsgeschwindigkeit, sowie dem Lebensalter. Des weiteren hängt sie neben der Malignität des Tumors auch von der Radikalität der angewandten Therapie ab (Chicoine und Silbergeld 1995).

Trotz Einsatz verschiedener therapeutischer Optionen ist die Prognose der niedriggradigen Gliome im Vergleich zu anderen gut differenzierten Tumoren sehr schlecht. Hier spielt die Progression zu einem höheren WHO-Grad aufgrund der genomischen Instabilität zur progredienten Enddifferenzierung, einen entscheidenden prognostischen Faktor (Mohan et al. 1998). Dies zeigt sich im Mittel nach 3-6 Jahren in einer plötzlichen Wachstumsprogredienz und fokaler Kontrastmittelaufnahme. Die mediane Überlebenszeit für niedriggradige Gliome liegt zwischen 7 und 8 Jahren (Kreth et al. 1995, Waha et al. 1996).

Die höhergradigen Astrozytome sind nicht heilbar. Für das anaplastische Astrozytom (WHO-Grad III) liegt die 2-Jahres und 5-Jahres-Überlebensrate bei 46% und 31% (Davis et al. 1999). Bei den Glioblastomen beträgt das mediane Überleben etwa 12 Monate. Die 2-Jahres- und 5-Jahres-Überlebensrate liegt hier bei 9% und 3% (Davis et al. 1999).

Durch eine kombinierte Therapie mit Operation und Bestrahlung kann die Überlebenszeit bei dieser Tumorgruppe auf das 3-fache erhöht werden (Jellinger 1987). Eine zusätzliche Erweiterung ist mittels adjuvanter Chemotherapie bis heute nur geringfügig möglich.

Trotz aller angewandten Therapieoptionen hat sich die Überlebenszeit der Gliompatienten kaum verlängert. Hier besteht die Notwendigkeit neue Alternativen in der Therapie dieser Tumorerkrankungen zu finden.

### 1.1.7 Therapie

Für die Therapie der malignen Gliome gibt es in den letzten Jahren im Bereich der Neurochirurgie ein rasch expandierendes Feld. Trotz einer ständigen Verbesserung der operativen Möglichkeiten ist bei der Indikation zur chirurgischen Therapie der Gliome zu beachten, dass diese Tumoren aufgrund ihres Potentials zur diffusen Infiltration des umgebenden Gehirns im eigentlichen Sinne nicht heilbar sind (Giese et al. 2003).

Grundlage einer primären OP-Indikation ist einerseits die Entfernung oder Verkleinerung der Tumormasse zur Beseitigung einer raumfordernden Wirkung, andererseits die histologische Diagnosesicherung. Eine lokale oder generalisierte Massenverschiebung stellt ebenfalls eine dringliche OP-Indikation dar (Giese et al. 2003).

Bei den astrozytären Tumoren WHO-Grad IV (Glioblastome) ist der Erkrankungsverlauf durch eine Operation allenfalls kurzfristig beeinflussbar. (Salcmann 1996).

Retrospektiven Studien zur Folge besteht eine positive Korrelation zwischen Radikalität der Glioblastomresektion und der Überlebenszeit (Lacroix et al. 2001). Hier ist das Lebensalter der Patienten und die Lage des Tumors entscheidend für die Therapieergebnisse, wobei jüngere Patienten insgesamt eine bessere Prognose aufweisen. Eine weitgehende Resektion dient lediglich als Vorbereitung zur weiteren Therapie (Fine et al. 1993).

Trotz makroskopisch weitgehender Entfernung besteht bei allen abgehandelten Tumoren die Gefahr einer Rezidivbildung. Nach einer Rezidivoperation liegt die mittlere Überlebenszeit für anaplastische Astrozytome bei 15-22 Monaten und für Glioblastompatienten bei 5-9 Monaten (Dirks et al. 1993).

Während die operative Therapie zur histologischen Sicherung, der Verminderung der Tumormasse und Minderung des intrakraniellen Druckes ausgelegt ist, ist das Ziel der kurativen Strahlentherapie die Abtötung klonogener Tumorzellen unter Schonung von gesundem Gewebe. Sie dient nur selten zur primären Behandlung, vielmehr ist die Strahlentherapie eine adjuvante und aditive Behandlungsmodalität. Hier hängt die Indikation in erster Linie von der histologischen Klassifikation sowie von der Tumorlokalisation und Ausdehnung ab.

Als Primärindikation für Radiotherapie gelten alle malignen, inoperablen Hirntumoren mit Symptomatik, sowie hochstrahlensensible Tumoren.

Auch nach einer kompletten Resektion ist eine postoperative Strahlentherapie obligat (Bouffet et al. 1992).

Besonders in der Behandlung der astrozytären Tumoren besitzt die Chemotherapie gegenüber der Operation und Strahlentherapie eine nachgeordnete Rolle und kann nur als Ergänzung eingesetzt werden. In der Behandlung der Astrozytome wird die Chemotherapie ausschließlich als adjuvante Therapie eingesetzt.

Andere Therapieformen wie Radiochirurgie, Immun- oder Gentherapie sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt für die Behandlung der intrakraniellen Tumoren nicht ausreichend erforscht.

Trotz des enormen Fortschrittes in der modernen Medizin ist die Therapie der Gliome und besonders der Glioblastome bis heute noch sehr unbefriedigend. Dies erfordert eine Suche nach neuen Therapieoptionen. Hier sind, nicht zuletzt durch das bessere Verständnis der molekularbiologischen Zusammenhänge der Krebskrankheiten und der Entwicklung neuer Substanzen mit neuen Wirkmechanismen, am ehesten in der Chemotherapie neue Möglichkeiten zu erwarten, die zu einer Verbesserung in der Behandlung der bösartigen Hirntumoren führen könnten (Neuroonkologie Schlegel/Weller/Westphal 1998).

## 1.2 Weihrauch

### 1.2.1 Geschichtlicher Überblick

Einer alttestamentarischen Legende zu Folge hatte Adam die Erlaubnis, bei der Vertreibung aus dem Paradies den Weihrauchbaum mit sich zu nehmen. Bereits im Altertum spielte Weihrauch eine herausragende Rolle bei der Götterverehrung, sowie als Räuchermittel für kirchliche und meditative Zwecke.

In Ägypten diente der Weihrauch nicht nur als Zeichen für die Offenbarung einer Gottheit, sondern auch als eine Verkörperung derselben. Die Übersetzung der ägyptischen Bezeichnung für Weihrauch ist „*Gottesduft*“ und „*der Stoff, der göttlich macht*“. Die ersten ägyptischen Importlisten für Weihrauchharz entstammen bereits aus dem dritten Jahrtausend vor Christi (Martinetz 1989).

Die ägyptische Königin Hatshepsut (1490-1468 v.Chr.) entsandte eine einzigartige Expedition in das Land Punt, das wahrscheinlich im Ost-Sudan gelegen war und transferierte lebende Weihrauchbäume nach Ägypten (Kluge et al. 1998).

Darüber hinaus war schon vor Jahrhunderten der günstige Effekt des Weihrauchs in der Medizin besonders bei chronisch entzündlichen Erkrankungen bekannt. Weihrauch wird auch als Bestandteil verschiedener Kosmetika, vor allem aber von Parfüms verwendet.

Neben frühesten schriftlichen Hinweisen auf den arabischen Weihrauchbaum wird später auch der Weihrauch aus Indien erwähnt. Der indische Weihrauch (Salai-Guggal) hatte bereits in der traditionellen Medizin (Ayurveda) als Heilmittel eine große Bedeutung. Hier wurde zur Behandlung von Wunden und Geschwüren Weihrauch in Form von Extrakten, Pulver und Salbenzubereitungen verwendet.

Des weitem wurde Weihrauch als Mittel gegen Tuberkulose, Arthritis, Gicht und Rheuma geschätzt. Durch seine sedierende Wirkung wurde er auch zur Behandlung einiger Nervenkrankheiten verordnet (W.Simonis 1991).

### 1.2.2 Die Botanik des Weihrauchs

Pflanzliche Harze sind Produkte des sekundären Stoffwechsels, d.h. sie dienen weder dem Wachstum noch dem Energiestoffwechsel der Pflanze. Es handelt sich bei ihnen um Mischungen mit äußerst unterschiedlicher Zusammensetzung und Eigenschaften.

Weihrauchharz wird ausschließlich von den Vertretern der Gattung *Boswellia* gebildet. Ihre Heimat ist Indien, die südliche arabische Halbinsel (Oman, Yemen), einige Länder Afrikas (v. a. Somalia, Äthiopien, Kenia) sowie einige weitere geographisch eng umrissene Gebiete (Madagaskar, Socotra).

Alle *Boswellia*- Arten zeichnen sich durch buschartigen bis baumähnlichen Wuchs, Blattwerk und 3-5 m Höhe aus. Weihrauchharz tritt selten spontan aus, in der Regel wird das Austreten durch Einschnitte ausgelöst (Raffaelli et al. 2003).

Die bedeutendsten Weihrauchharz liefernden Länder befinden sich am Horn von Afrika und auf der südlichen arabischen Halbinsel. Indisches Weihrauchharz ist in der Parfümerie und für Räucherzwecke von geringer Bedeutung, aber in der medizinischen Anwendung gefragt.

Als Stammpflanzen gelten im wesentlichen die folgenden Boswellien:

- *Boswellia sacra* Flueck in Südarabien
- *Boswellia carteri* In Somalia
- *Boswellia frereana* In Somalia
- *Boswellia serrata* ( Salai- oder Saphalbaum) In Indien

Als Standort bevorzugen die Boswellien trockene und felsige Böden. Die Bäume bilden breite und flache Wurzeln aus, mit denen sie das wenige Regenwasser optimal nutzen können.

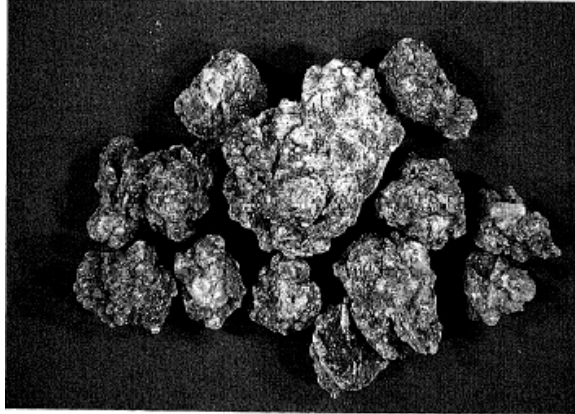
Die Weihrauchgewinnung ist für viele Regionen ein wichtiger Wirtschaftsfaktor. Die Beduinen verfüttern die saftigen Blätter dieser Bäume gerne an ihre Ziegen und Kamele und benutzen die Äste auch als Brennholz. Dadurch wird der Bestand an Weihrauchbäumen in manchen Gebieten stark gefährdet (Raffaeli et al. 2003).

### **1.2.3 Die Weihrauchernte**

In den Zwischenzellräumen der Weihrauchbäume bildet sich ein milchiger Saft, der beim Einschneiden der Stämme austritt. Das Einschneiden wird in den Monaten März und April durchgeführt. Die beim ersten Arbeitsvorgang austretende klebrig-milchige Flüssigkeit gerinnt nach einigen Tagen zu kleinen Tränen. Diese werden beim zweiten Arbeitsvorgang, der etwa nach drei Wochen stattfindet abgekratzt. Verwenden kann man dieses minderwertige Harz nicht. Erst das danach austretende Harz ist von guter Qualität. Es trocknet ebenfalls zu tränen- oder zapfenförmigen, gelblichen Klumpen ein. Nach etwa ein bis zwei Wochen wird es dann geerntet.



***Abbildung 1: Harz des indischen Weihrauchbaum***



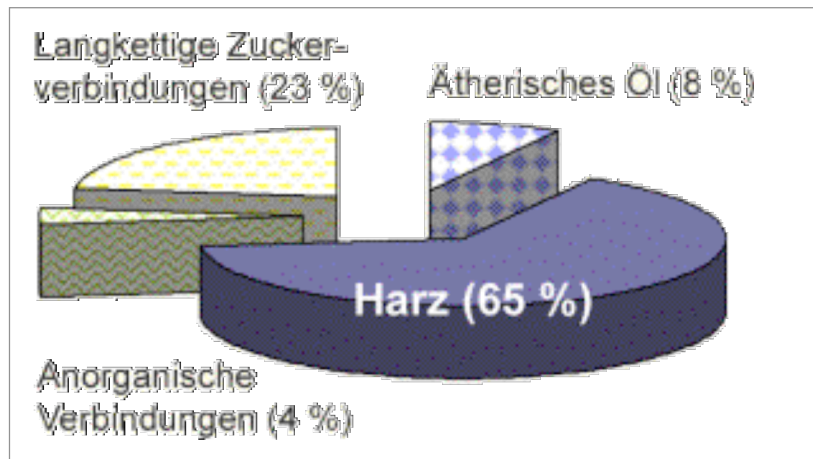
Der Weihrauchbaum darf höchstens in drei aufeinanderfolgenden Jahren abgeerntet werden. Während einer Ernteperiode erbringt ein Weihrauchbaum zwischen drei bis zehn Kilo Harz.

Die größte Menge liefern Bäume, die eine mehrjährige Erholungsphase hinter sich haben. Heute unterscheidet man Weihrauchharz im Wesentlichen in Olibanum, das sogenannte „arabische Harz“, welches jedoch hauptsächlich aus Äthiopien und Somalia stammt und Salai Guggal, welches in Ostindien geerntet und für medizinische Zwecke verwendet wird (Martinetz 1989).

Olibanum gehört zu den Gummiharzen, das heißt es enthält neben den typischen Harzinhaltsstoffen und ätherischen Ölen einen hohen Anteil an Polysachariden.

Die Hauptinhaltsstoffe des indischen Weihrauchs aus *Boswellia serrata* sind in Tab. 3 dargestellt.

**Tab. 3: Hauptinhaltsstoffe des Weihrauchs**



• Wasser	10-12 %
• Harz	57-65 %
• Gummi	20-23 %
• ätherisches Öl	8 - 9 %
• unlösliche Bestandteile	4 - 5 %

Die wichtigsten Inhaltsstoffe enthalten in unterschiedlicher Zusammensetzung folgende ätherische Öle:

- alpha und beta- Pinen : ein Terpenkohlenwasserstoff, der farblos und flüssig ist und in der Kosmetikherstellung Verwendung findet.
- d-alpha- Phellandren : ein Bestandteil zahlreicher natürlicher Duft- und Heilöle.

- Camphen: ein in vielen ätherischen Ölen vorkommender ungesättigter Terpenkohlenwasserstoff der auch als Riechstoff Verwendung findet.
- Limonen : ein ungesättigter Terpenkohlenwasserstoff mit zitronenartigem Geruch.
- 1,8-Cineol auch Eucalyptol genannt: eine farblose, kampferähnlich riechende Substanz, der auch zur Inhalation bei Bronchialkatarrhen Verwendung findet.
- Terpeneol : ein ungesättigter Terpenalkohol

Darüber hinaus sind schätzungsweise mehr als 60 andere Stoffe im Weihrauch enthalten, die durch ihre besondere Zusammenwirkung und Synergie die einzigartige Heilkraft des Weihrauchs ermöglichen (H. Kluge et al. 1998).

### **1.3 Boswelliasäuren**

#### **1.3.1 Boswelliasäuren - saure Bestandteile des Weihrauchharzes**

Pflanzliche Harze und damit auch Weihrauchharz werden bereits seit mehreren Jahrtausenden gesammelt, verarbeitet, gehandelt und mannigfaltig verwendet. Untersuchungen zu ihrer molekularen Zusammensetzung gehen bis in die Anfänge der wissenschaftlichen Chemie zurück (Tschirch, Halbey 1898).

ALEXANDER TSCHIRCH (1865-1939) und seine Mitarbeiter führten die ersten grundlegenden Untersuchungen zum Weihrauchharz und Harz anderer Pflanzen durch. 1898 wurden Ergebnisse erster systematischer Arbeiten zu sauren Komponenten im Weihrauch publiziert.

HALBEY erhielt durch alkoholisches Extrahieren von Weihrauchharz und Isolieren der Säurefraktion durch Ausfällen der ätherischen Lösung mit Sodalösung und wiederholten Umfällen des isolierten Rohproduktes „Boswellinsäure“ (Tschirch, Halbey 1898).

Diese Verbindung wurde von den Autoren als einbasige Säure der Summenformel  $C_{32}H_{52}O_4$  ohne freie Hydroxylgruppe charakterisiert. Die Isolierung der nach Halbey gewonnenen "Boswellinsäure" in Reinsubstanzen,  $\beta$ -Boswelliasäure ( $\beta$ -BA), 3-O-Acetyl- $\beta$ -Boswelliasäure ( $\beta$ -ABA) und deren Isomere  $\alpha$ -Boswelliasäure ( $\alpha$ -BA) und 3-O-Acetyl- $\alpha$ -Boswelliasäure ( $\alpha$ -ABA) erfolgte durch Winterstein und Stein. Darüber hinaus bestimmten sie neben dem Schmelzpunkt und dem Drehsinn auch die korrekte Summenformel mit  $C_{32}H_{50}O_4$  (Winterstein und Stein 1932).

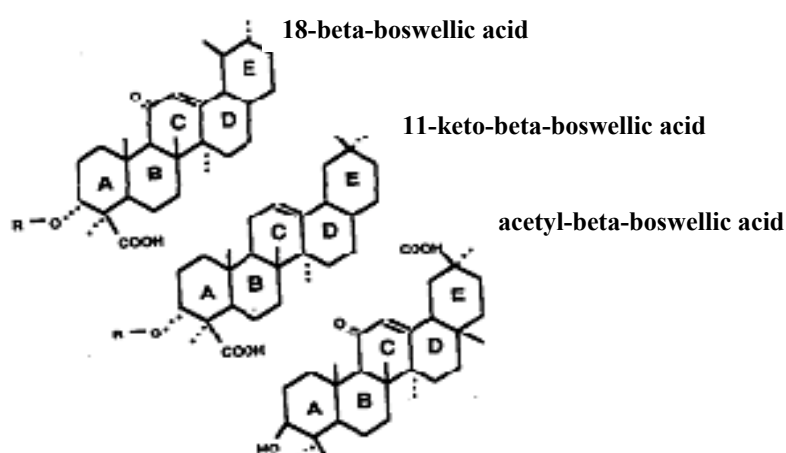
Die Strukturanalyse der Boswelliasäuren bekam durch die Einführung der Massenspektrometrie einen großen Schub. PARDHY und HAIRFIELD konnten erstmalig mit dieser Technik verschiedene Boswelliagruppen unterscheiden (Pardhy 1978, Hairfield 1984).

Eine Erweiterung der Gruppe der bekannten Boswelliasäuren, um die beiden Boswelliasäuren mit einer 11-Keto-Funktion (11-Keto- $\beta$ -Boswelliasäure ( $\beta$ -KBA) und 3-Acetyl-11-Keto- $\beta$ -Boswelliasäure ( $\beta$ -AKBA)) erfolgte in den 70er Jahren durch PARDHY und BHATTACHARYYA. Darüber hinaus veröffentlichten sie einige charakteristische  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Verschiebungen (nuclear magnetic resonance).

Die Veröffentlichungen der Röntgenstrukturen von  $\beta$ -AKBA und  $\beta$ -ABA einerseits und NMR-Verschiebungen andererseits vervollständigen die Strukturaufklärung der Boswelliasäuren (Schweizer et al. 2000, Rajnikant 2001).

Die Boswelliasäuren gehören zur Gruppe der Triterpenoide, die entweder frei oder als Saponine mit glykosidisch gebundenen Zuckern in einer Vielzahl von Pflanzen vorkommen. Sie besitzen durch ihre mannigfaltige Struktur und variable Funktionalisierung ein großes Spektrum chemischer Eigenschaften und pharmakologischer Wirkungen (Mahato et al. 1992, al-Said 1990).

**Abbildung 2: Strukturformel der Boswelliasäuren**



Boswelliasäuren mit einem Oleanan- bzw. Ursangerüst ( $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Boswelliasäuren) und ihre Derivate sind bislang ausschließlich aus dem Harz von Vertretern der Gattung *Boswellia* isoliert worden. Nach aktuellem Kenntnisstand besteht der größte Teil der Säurefraktion im Weihrauchharz aus Boswelliasäuren. Ein geringer Prozentsatz besteht aus Derivaten der Boswelliasäure und anderen Säuren (Mahajan et al. 1995).

Die Verteilung der Komponenten im Weihrauchharz wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Sie unterliegt einer natürlichen Schwankungsbreite.

### 1.3.2 Pharmakologische Wirkung

Die Triterpene sind eine umfangreiche Familie von Naturstoffen. Ihre mehr als 4.000 Vertreter weisen bis auf den gemeinsamen Biosyntheseweg kaum Ähnlichkeiten auf. Grundgerüst, Grad, Art der Funktionalisierung und damit die chemischen Eigenschaften unterscheiden sich beträchtlich und so auch in ihrer pharmakologischen Wirkung wie z.B. Entzündungshemmung (Recio et al. 1995).

Die Forschungen der letzten zwei Jahrzehnte haben zu einer Fülle von Erkenntnissen über die Wirkung und die klinische Anwendung von Weihrauchextrakten geführt. Besonderes Augenmerk galt dabei den Boswelliasäuren als den gattungsbestimmenden Inhaltsstoffen.

Die erste Veröffentlichung über die pharmakologisch bedeutsame Wirkung der Boswelliasäuren beschrieb die Inhibierung der 5-Lipoxygenase. 1991 publizierten AMON und Mitarbeiter unter anderem den Wirkmechanismus der 5-Lipoxygenase-Inhibierung und die strukturellen Voraussetzungen für eine effektive Inhibierung (Ammon et al. 1991, Safayhi et al. 1992, 1995, 1996).

#### 1.3.2.1 5- Lipoxygenase

Die 5-Lipoxygenase ist ein Schlüsselenzym beim Entzündungsgeschehen. Die charakteristischen Entzündungssymptome wie Rötung, Schwellung, Schmerz und gestörte Organfunktion werden durch verschiedene Entzündungsmediatoren hervorgerufen. Zu diesen gehören unter anderem Prostaglandine und Leukotriene, die über die Arachidonsäurekaskade gebildet werden (siehe Kapitel 1.4.1). Durch einen Entzündungsreiz werden die Arachidonsäuren, die in biologischen Membranen verestert vorliegen, von Phospholipasen freigesetzt. Diese freien Säuren werden

durch Cyxlooxygenasen zu Prostaglandinen und Thromboxanen, durch die 5-Lipoxygenasen zu Leukotrienen umgesetzt.

Die vier wichtigsten  $\beta$ -Boswelliasäuren ( $\beta$ -Boswelliasäure, 3-O-Acetyl- $\beta$ -Boswelliasäure, 11-Keto- $\beta$ -Boswelliasäure, 3-Acetyl-11-Keto- $\beta$ -Boswelliasäure) hemmen die 5-Lipoxygenase mit  $IC_{50}$ -Konzentrationen von 1,5-7  $\mu$ M (Ammon et al. 1993, Safayhi et al. 2000).

### 1.3.2.2 Boswelliasäuren

Die 3-Acetyl-11-Keto- $\beta$ -Boswelliasäure zeigt die stärkste 5-Lipoxygenase-Inhibierung der vier  $\beta$ -Boswelliasäuren. Im Gegensatz zu vielen bekannten Hemmstoffen der Leukotrienbiosynthese haben Boswelliasäuren keinen antioxidativen Effekt (Safayhi et al. 1992). Vielmehr handelt es sich hierbei um nicht redoxvermittelte, nicht kompetitive, aber reversible Wirkungen der Boswelliasäuren an der 5-Lipoxygenase (Safayhi et al. 1995). Mittlerweile konnte auf der 5-Lipoxygenase eine Calcium-regulierende Bindungsstelle für Boswelliasäuren identifiziert werden (Seiler et al. 1997).

Neben den oben genannten hemmenden Wirkungen der Boswelliasäuren auf die Leukotrienbildung konnte man bei höheren Konzentrationen von Acetyl-11-keto- $\beta$ -Boswelliasäuren (15 $\mu$ M) eine Hemmung der enzymatischen Aktivität von Elastasen beobachten. Die dafür nötigen Konzentrationen liegen deutlich höher als die zur Hemmung der Leukotriensynthese (Safayhi et al. 1997).

Weiterhin zeigen In-vitro-Untersuchungen in neuerer Zeit eine Proliferations-hemmung der Leukämie- und Glioblastomzellen durch Boswelliasäuren. Hier ist die Wirkung nicht durch die Hemmung der 5-Lipoxygenase sondern vielmehr durch eine Induktion von Apoptose sowie die Hemmung der Topoisomerasen bedingt. Dabei vollzieht sich ihre Antitumorwirkung erst bei wesentlich höhern Konzentrationen (Heldt et al. 1997). Topoisomerase katalysiert die Interkonversion von

verschiedenen DNA-Isomeren und initiiert die Spaltung einer oder beider DNA-Stränge (Siehe Kapitel 1.4.2).

### 1.3.3 Medizinische Anwendung

In der traditionellen Medizin vieler Länder werden Weihrauchharz und daraus hergestellte Zubereitungen gegen eine Reihe von Erkrankungen eingesetzt. Neben einem religiösen Ursprung oder die frühe Art der Aromatherapie dürfte es sich bei einigen Anwendungen schon um frühe Beispiele einer rationalen Pharmakotherapie gehandelt haben. Hier wurden z.B. ethanolische Weihrauchharzlösungen zur Wundbehandlung verwendet, was durch das Verschließen der Wunde und der bakteriziden Wirkung der Monoterpene nachvollziehbar ist. Bereits im 16. Jahrhundert war Olibanum in deutschen Apotheken zu finden und noch bis weit ins 20. Jahrhundert in vielen europäischen Arzneibüchern verzeichnet. Bei der Verwendung von Weihrauchharz zu medizinischen Zwecken kann im Europa des 20. Jahrhunderts von einer Renaissance gesprochen werden (Imbesi 1964).

Zurzeit wird die Wirkung der Weihrauchharz- Extrakte auf die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eingehend erforscht. Beide Krankheiten sind durch unklare Ätiologie und chronischen Verlauf gekennzeichnet. Während die klinischen Studien zur Anwendung von Weihrauchharz bei Colitis ulcerosa noch weiterer Klärungen bedürfen zeigt der Einsatz von Weihrauchpräparaten bei Morbus Crohn eine direkte Wirkung und Verbesserung der Lebensqualität (Gupta et al. 2001, Seifert et al. 2001).

Bei den klinischen Untersuchungen anderer Erkrankungen wie Bronchialasthma (Guptla et al. 1998), primär chronischer Polyarthrit (Sander et al. 1998) oder Behandlung von malignen Hirntumoren liegen meist wenige (Pilot-)Studien mit positivem Ausgang vor.



Die folgende Tabelle soll die historische und moderne medizinische Verwendung von Teilen des Weihrauchbaumes veranschaulichen.

**Tab. 4: Historische und moderne medizinische Verwendung von Teilen des Weihrauchbaumes (Martinetz 1989)**

Boswellia-Spezies	Pflanzenteil	Verwendung
Verschiedene	Harz	Viele Länder: Asthma, Uterusleiden, in Pflastern und Salben, Haut- und Blutkrankheiten, Fieber, Schlangenbisse, Krämpfe, Katarrh, Aus-schlag, Pflasterherstellung
	Rinde	Indien: Asthma, Dysenterie, Geschwüre, Hautkrankheiten, „zur Blutreinigung“
	Früchte, Blüten	Leukodermie, Hämorrhoiden
<i>B. serrata</i>	Harz	Indien: Rheuma, „Nervenleiden“, Diabetes, Magenbeschwerden, Haut-, Lungen- und weitere Krankheiten, Durchfall, Dysenterie, Lungen- und Hauterkrankungen, Fieber, Geschwüre und weitere Krankheiten
	Rinde	Indien: Epilepsie, Leukodermie, Rippenfellentzündung, Schlangenbisse, Wundbehandlung, Erkältungen, Durchfall, Hauterkrankungen
	Blätter	Indien: Wundbehandlung, Augenkrankheiten
	Samen	Indien: Schlangenbisse, Haarwuchsmittel
	Ganze Pflanze	Indien: Antiseptikum
<i>B. dalzielii</i>	Ganze Pflanze	Afrika: Wundbehandlung
	Blätter, Wurzelrinde	Afrika: Irrsinn
	Rinde	Afrika: Windpocken, Schlangenbisse, Magen-Darm-Beschwerden, Fieber, Rheuma, Schmerzen, Schwindel, Dysenterie
	Wurzel	Afrika: Syphilis
	Wurzel, Rinde	Afrika: Gegenmittel bei Pfeilgiften, Emetikum
	Harz	Afrika: als Antiseptikum
<i>B. microphylla</i>	Wurzel	Somalia: Durchfall
<i>B. neglecta</i>	Wurzel	Gonorrhö, als Diuretikum
<i>B. ovalifoliolata</i>	Stamm(rinde)	Indien: Hydrozele, Entzündungen, Schwellungen, Magengeschwüre

#### 1.3.4 H15 (Äthanolisches Extrakt der Boswelliasäure)

Wie in vielen (prä)klinischen Untersuchungen wurde die vorliegende Studie mit dem Präparat H15 durchgeführt, das aus dem Harz des indischen Weihrauchbaumes (*Boswellia serrata*) hergestellt wird. Andere Forschungsgruppen verwendeten reine Boswelliasäuren, grob aufgereinigte Boswelliasäuren (Zhao et al 2003), selbst hergestellte Weihrauchextrakte oder homöopathische Medikamente (Dahmen et al. 2001). Die fehlende Angabe zu Weihrauchspezies und verwendeten Weihrauchzubereitung erschweren die Vergleichbarkeit der Studien.

Untersuchungen von Ennet et al. zur Folge scheint H15, das auf herstellereigenen Plantagen der *Boswellia serrata* gewonnen wird, gewissermaßen „von Natur aus standardisiert“ zu sein. Die HPLC- und Dünnschicht- Chromatogramme zeigen bei *Boswellia serrata* weitgehend konstante Boswelliasäure-Gehalte über viele Chargen hinweg, so dass hier von einem konstanten Wirkstoffgehalt ausgegangen werden kann (Ennet et al. 2000).

Die mangelnde Verfügbarkeit großer Mengen an boswelliasäurehaltigen Substanzen, sowie der hohe Preis dieser Verbindungen haben bis heute zu einer mangelhaften Erforschung des Wirkprofils der Boswelliasäuren geführt. Obwohl die Boswelliasäuren bisher als aktive Inhaltsstoffe identifiziert worden sind, kann man prinzipiell weitere aktive Inhaltsstoffe nicht ausschließen.

#### 1.3.5 Nebenwirkungen

Bezüglich der Nebenwirkungen nach einer Therapie mit Boswelliasäuren liegen bisher nur wenige Daten vor.

Während in den Studien von JANSEN et al. 2000 und STERRER et al. 2001 eine gute Medikamentenverträglichkeit beobachtet wurde, klagte in

einer Studie von BOEKER et al. einer von insgesamt 29 Patienten über Übelkeit und Erbrechen. Bei zwei weiteren Patienten entwickelten sich nach zwei Tagen Hautausschläge, die symptomatisch behandelt wurden (Boeker et al. 1997). Alle genannten Nebenwirkungen waren nach dem Absetzen reversibel.

In weiteren Studien wurde nach einer Behandlung mit Weihrauchextrakt über gastrointestinale Beschwerden, Hyperazidität sowie Appetitlosigkeit und Brennen hinter der Brust berichtet. (Gupta et al. 1997 u. 1998).

## ***1.4 Biologische und immunologische Aspekte***

### **1.4.1 Leukotriene**

#### **1.4.1.1 Eicosanoide und Arachidonsäuren**

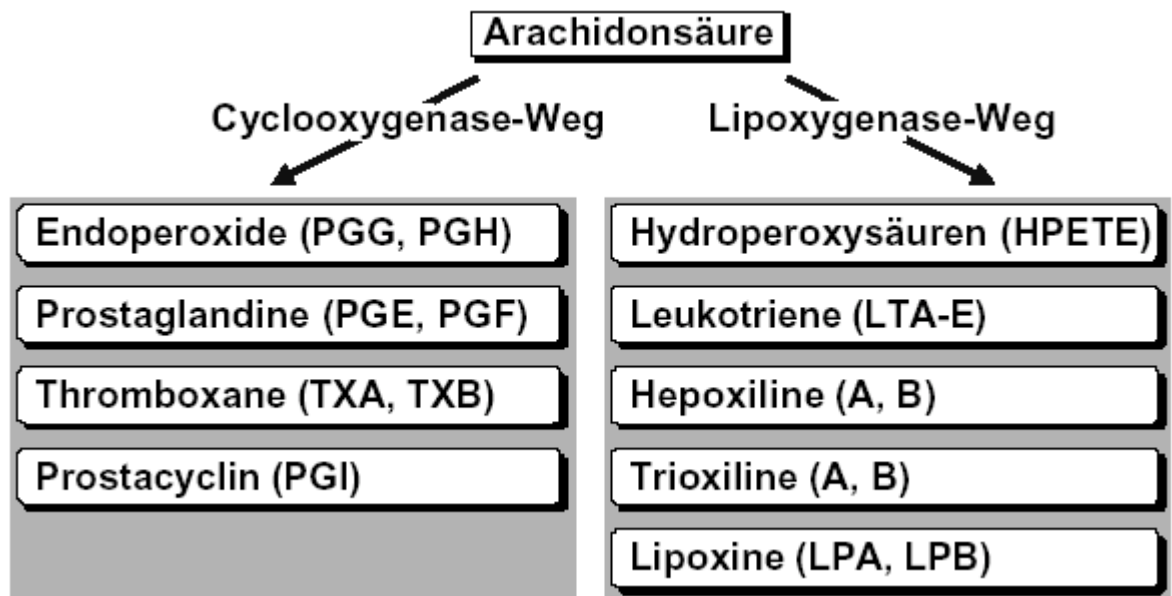
Eicosanoide sind eine besondere Familie der Mediatoren. Zu Ihnen zählen die Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxane, Leukotriene und Hydroperoxy- und Hydroxyfettsäuren.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren dienen im Organismus als Vorstufen einer Vielzahl reaktiver Regulationsstoffe, die sich von der Arachidonsäure, (5Z,8Z,11Z,14Z)-5,8,11,14-Eicosatetraensäure (2.1.3) und wahrscheinlich auch weiteren mehrfach-ungesättigten C20-Fettsäuren ableiten.

Mit ihren 20 C-Atomen werden sie als Eicosanoide zusammengefaßt. Arachidonsäure wird auf zwei Wegen, dem Cyclooxygenase- und dem Lipoxygenase-Weg enzymatisch metabolisiert, wobei kaskadenartig eine Reihe biologisch aktiver Metaboliten entstehen (Abb. 3). Die Aufklärung von Strukturen und Funktionen der Eicosanoide geht im Wesentlichen auf

Arbeiten von S. BERGSTRÖM, B. SAMUELLSON und J.R. VANE (Medizin-Nobelpreise 1982) zurück.

**Abbildung 3: Cyclooxygenase- und Lipoxygenase-Weg des Arachidonsäure-Metabolismus**



Ein großer Teil der durch die Nahrung aufgenommenen, essentiellen Fettsäuren dient dem Körper zur Energiegewinnung. Ein kleiner Teil wird durch Kettenverlängerung und Desaturierung zur Arachidonsäure. Als eine endogene Speicherform enthalten Phospholipide der Zellmembran einen großen Anteil an Arachidonsäuren. Ihre enzymatische Freisetzung erfolgt durch die Phospholipasen.

Neben anderen Faktoren in der Eikosanoidbildung (wie z.B. Substratreacetylierung) ist die Phospholipase A2 ein Schlüsselenzym, dessen Aktivierung sowohl durch Rezeptoren als auch durch traumatisch oder entzündlich bedingte Membranschädigung erfolgen kann. Während die periphere Phospholipase A2-Aktivierung immer  $\text{Ca}^{++}$  abhängig verläuft ist der zentrale Mechanismus noch nicht bekannt.

Durch Cyclooxygenasen entstehen aus Arachidonsäuren zyklische Metaboliten. Primärprodukte sind die Endoperoxide, die anschließend enzymatisch zu Prostaglandinen, Thromboxanen bzw. Prostacyclinen umgewandelt werden.

Durch Lipoxygenasen entstehen azyklische, instabile, mehrfach ungesättigte Hydroperoxysäuren, die weiter zu Leukotrienen, Hepoxilinen, Trioxilinen und Lipoxinen metabolisiert werden.

Die Prostaglandine, Thromboxane, Prostacycline und die Leukotriene nehmen eine Mittelstellung zwischen klassischen Hormonen und Transmittersubstanzen ein und werden als "lokale Hormone" bezeichnet.

#### **1.4.1.2 Leukotriene Allgemein**

1938 konnten FELDBERG und KELLAWAY nach der Perfusion von Hundelungen mit Cobragift eine Substanz im Perfusat nachweisen, die langsame Kontraktionen an der glatten Muskulatur erzeugte. Sie nannten diese Substanz aufgrund der beobachteten Kontraktionsform slow reacting substance (SRS). Eine ähnliche Wirkung auf der glatten Muskulatur zeigte auch eine Substanz, die durch Antigenstimulation sensibilisierter Meerschweinchenlungen sezerniert wurde. 1960 bezeichnete BROCKLEHURST nach einer Differenzierung der SRS-Wirkung von der des Histamins am Meerschweinchenileum, die SRS von anaphylaktischen Meerschweinchenlungen als slow-reacting-substance of anaphylaxis (SRS-A). Spätere Untersuchungen der SRS-A zeigten, dass es sich um ein schwefelhaltiges, polares Lipid, mit UV-Absorption ähnlich dem der Arachidonsäure handelte. (Strandberg et al. 1973, Jakschin et al. 1977).

1979 entdeckten BERGEAT und SAMUELLSON einen mit dem SRS-A verwandten und in den peritonealen polymorphkernigen Leukozyten von

Kaninchen gebildeten Metaboliten. Sie identifizierten diese Struktur als 5(S), 12(R)-dihydroxy-6, 8,10,14-eicosatetraen-säure (LTB<sub>4</sub>).

Die Bezeichnung Leukotriene leitet sich aus dem Wort Leukozyten ab, da ihr Stoffwechselweg erstmalig durch Leukozyten entdeckt wurde. Während -triene- die drei Doppelbindungen und den Zahlenwert deren Zahl im Molekül bezeichnet, wird die Länge der Peptidketten durch die Buchstaben C,D,E,F beschrieben (z.B. LTC<sub>4</sub>= Leukotrien mit der C-Anordnung des Grundgerüsts und 4 Doppelbindungen).

Durch Oxidation der Arachidonsäure an C<sub>5</sub> unter Beteiligung der 5-Lipoxygenase und einer weiteren Transformation (Einführung eines Sauerstoffatoms) entsteht eine instabile Epoxid, Leukotriene (LT) A<sub>4</sub>. Eine Hydrolyse des Derivates führt zu LTB<sub>4</sub> und durch eine Koppelung von Glutathion unter Glutathion-S-Transferase entsteht LTC<sub>4</sub>. Durch weitere Metabolisierung und Abspaltung einer  $\gamma$ -Glutamyl entstehen LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>.

Das Enzym 5-Lipoxygenase stellt das Schlüsselenzym bei der Leukotriensynthese dar. Es befindet sich hauptsächlich im Zytosol und bindet auf einen zellulären Stimulus hin an die nukleäre Membran (Brock et al. 1994).

Die Gruppe der Cysteinyl-Leukotriene besteht aus den Substanzen Leukotrien C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> und E<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> und E<sub>4</sub>), hochpotenten Mediatoren für glattemuskuläre Kontraktionen sowohl in Bronchien, als auch in Lungenparenchymgewebe. Darüber hinaus stimulieren sie die Schleimsekretion in den Luftwegen und führen zu Kontraktion der Gefäßwandmuskulatur und der Endothelzellen von Kapillaren und Venolen, was über Plasmaextravasation zum vasogenen Ödem führt (Dahlen et al. 1980, Hanna et al. 1981, Marom et al. 1982, Badr et al. 1984, Dahlen et al. 1981). Neben den Cysteinyl-Leukotrienen werden

weiterhin Leukotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) sowie Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) und seine Metaboliten zu den Leukotrienen gezählt (Ford-Hutchinson et al. 1980).

#### 1.4.1.3 Cysteinyl- Leukotriene im zentralen Nervensystem

Leukotriene sind an einer Vielzahl pathophysiologischer Prozesse in den peripheren Organen und im zentralen Nervensystem beteiligt. Die Astroglia gelten als der Hauptsyntheseort der Leukotriene im Hirngewebe. Im zentralen Nervensystem gibt es eine Vielzahl an Lipoxygenasestoffwechselwegen für die Bildung von ungesättigten Fettsäuren. In Tierversuchen konnten Shimizu et al. 1987 in Hirnschnitten neben einer Ca<sup>++</sup>-abhängigen Lipoxygenase auch eine LTA<sub>4</sub>-Hydrolase nachweisen, die zur Synthese von LTB<sub>4</sub> führte.

Die Enzymaktivität der 5-Lipoxygenase ist innerhalb des ZNS unterschiedlich ausgeprägt. Während im Bulbus olfactorius und der Hypophyse die höchste Aktivität beschrieben wird, ist sie im Kleinhirn und Thalamus geringer (Shimizu et al. 1987).

In In-vitro-Untersuchungen konnte WINKING 1997 eine spontane Freisetzung von PGF<sub>2</sub> (Prostaglandin-F<sub>2</sub>) und immunoreaktiven Cysteinyl-Leukotrienen nach Inkubation menschlichen Hirngewebes beobachten. Darüber hinaus zeigte der Vergleich von Freisetzungsraten immunoreaktiver Cysteinyl- Leukotriene in der grauen und weißen Substanz eine deutlich höhere LTC<sub>4</sub>-Menge in der weißen Substanz. Ein weiterer Hinweis auf die Leukotrien- Synthesefähigkeit der Hirnzellen und die hohe biologische Aktivität dieser Substanzgruppe im Gehirn ist durch eine massive Leukotrienausschüttung nach Stimulation mit Ionophor A23187 gegeben (Winking 1997).

Über die Wirkung der Leukotriene auf Gefäßreagibilität und die Blut-Hirn-Schranke wurden z.T. kontroverse Ergebnisse publiziert. Während einige Autoren keine kontraktile Wirkung der Cysteinyl-Leukotriene in

alterierten Hirngefäßen von Ratten und auch Menschen fanden (Kamitani et al. 1985, Von Holst et al. 1982), berichten andere von Vasokonstriktionen cerebraler Arterien bei Mäusen, Ratten, Schweinen und Hunden (Tagari et al. 1983, Taylor und Tukmachi 1986, Shimizu et al. 1988).

Während UNTERBERG et al. 1991 keinen Effekt auf die Blut-Hirn-Schrankenpermeabilität nach Leukotrienstimulation fanden, wurde die Fähigkeit der Cysteinyl-Leukotriene zu Öffnung der Blut-Hirn-Schranke von anderen beschrieben (Robichaud und Marcoux 1990, Ohnishi et al. 1992). Möglicherweise ist diese Diskrepanz in den Ergebnissen durch die Auswahl der Versuchstiere entstanden.

Entscheidend für die Veränderung der Blut-Hirn-Schrankenpermeabilität sind neben der Synthesefähigkeit der Cysteinyl-Leukotriene im gesunden Hirngewebe existierende Abbaumechanismen zur raschen Inaktivierung. Der Ausfall einer der beiden Faktoren kann zu einem erhöhten Spiegel aktiver Cysteinyl-Leukotriene mit Folgereaktionen führen (Winking 1997).

#### **1.4.1.4 Cysteinyl-Leukotriene im Hirntumorgewebe**

1987 konnten CASTELLI et al. nachweisen, dass die Syntheseleistung für verschiedene Prostanoiden, die wie Leukotriene zu Gruppe der Eicosanoide gehören, in humanen Astrozytom- und Glioblastomhomogenisaten höher lag als jene von Homogenisaten angrenzender normaler Hirngewebe (Castelli et al. 1987).

1989 zeigten die Untersuchungen von SIMMET et al., dass Meningeome wie auch Astrocytome die Fähigkeit zur Leukotriensynthese besitzen. Durch in-vitro-Experimente mit blutfreien Hirngewebsschnitten konnte in den Tumorgeweben eine Cysteinyl-Leukotriensynthese nachgewiesen werden, die im Vergleich zur normalen humanen Hirnschnitte um ein Vielfaches höher lag. Eine Stimulation der Glioblastomschnitte mit Ionophor A23187 führte zu einer deutlichen Steigerung der



Leukotrienausschüttung im Vergleich zur basalen Produktionsrate der gleichen Schnitte (Simmet et al. 1989).

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch WINKING 1997 durch in vitro-Untersuchungen am menschlichen Hirntumorgewebe. Darüber hinaus konnte er aus seinen Ergebnissen eine eindeutige Korrelation zwischen der biosynthetischen Kapazität der Gewebe zu Cysteinyl-Leukotriene-Synthese und ihrem Malignitätsgrad feststellen (Winking et al. 1997).

In weiteren In-vivo-Studien konnten bei Patienten mit malignen Astrozytomen hohe Mengen an LTE<sub>4</sub> im präoperativen Urin gemessen werden. Darüber hinaus wurde bei ausgeschlossener Zweiterkrankung und fehlender Nierenfunktionsstörung eine Beziehung zwischen der Leukotriensyntheserate und dem Malignitätsgrad, aber auch der Masse des neoplastischen Gewebes festgestellt. Hier zeigte sich ein Abfall der postoperativen Ausscheidungswerte im Urin von bis zu 90% nach 7 Tagen und über 90% nach 14 Tagen im Vergleich zu präoperativ gemessenen Werten (Winking und Simmet 1992).

Auch für die pathophysiologische Bedeutung der Cysteinyl-Leukotriene bei der Entstehung des peritumoralen Hirnödems gab es überzeugende Hinweise. Die Permeabilität der Bluthirnschranke wird neben der Synthese vasoaktiver Substanzen wie Leukotriene, auch durch die Synthese von Enzymen, die zu Inaktivierung dieser Substanzen führen, beeinflusst. Während das normale Hirngewebe eine hohe Konzentration an  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase, welche Cysteinyl-Leukotriene inaktivieren kann, besitzt, wird dieses Enzym im Gliomgewebe nicht gefunden (Aharony und Dobson 1984). Die kontinuierliche Cysteinyl-Leukotriensynthese im Tumorgewebe kann somit bei einem verminderten Abbau durch  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase in das benachbarte Hirngewebe diffundieren und zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität führen (Winking und Simmet 1992).

Die Gefäßstrukturen von Gliomen zeigen häufig ultrastrukturelle Abnormitäten wie erhöhte Pinozytosen und Fenestrierungen. Hier kommt es zu einem Kontaktverlust zwischen Tumorgefäßen und normalen Astrozyten mit Aufhebung der regelrechten Blut-Hirn-Schrankenfunktion (Stewart et al. 1985). Diese strukturellen Veränderungen und funktionellen Dysregulationen zwischen Hirn- und Hirntumorzelle gepaart mit Leukotrienwirkung auf die Gefäße und auf die Blut-Hirn-Schranke können zum Austritt der Serumbestandteile in den extrazellulären Raum von Tumorzellen aber auch Hirnzellen führen und ein Ödem erzeugen.

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (Gaetani et al. 1991, Baba et al. 1992) zeigten die Untersuchungen von WINKING 1997 eine Korrelation zwischen dem perifokalen Ödem und der Höhe von ausgeschiedenem LTE<sub>4</sub> im Urin und gab den Hinweis, dass die Ödembildung unter anderem von der Leukotriensyntheserate des Tumors beeinflusst wird.

## **1.4.2 Topoisomerasen**

### **1.4.2.1 Allgemeines**

DNA- Topoisomerasen sind lebensnotwendige, im Zellkern lokalisierte Enzyme, die wichtige Teilfunktionen von komplexen Prozessen wie Replikation und Translation der DNA übernehmen. Sie sind an der Organisation des Erbgutes beteiligt (Osterhoff 1986, Jazwinski und Edelman 1984, Mattern et al. 1982).

Die Topoisomerasen sind für den regulären Ablauf der zellulären Vorgänge von großer Bedeutung. Sie ermöglichen eine reibungslose Entwindung der komplexen DNA-Doppelhelix-Struktur im Zellkern. (Wang 1996).

Die normalerweise in einer kompakten Form vorliegenden DNA- Moleküle müssen für den Ablesevorgang zumindest partiell entwunden werden, was

jedoch nicht durch einfache Deformierungsvorgänge wie Dehnung oder Biegung erreicht werden kann. Hier muß eine Topologieänderung, d.h. Veränderung der totalen Windungszahl des DNA- Stranges erfolgen. Hierbei kommt es zur vorübergehenden Durchtrennung der DNA-Stränge mit anschließender Windungszahländerung und Wiederverknüpfung der DNA- Enden. Ubiquitäre Enzyme, welche die Fähigkeit haben die Topologie der DNA zu verändern und somit deren Torsionsspannung niedrig zu halten, werden Topoisomerasen genannt (Stryer 1996).

Inzwischen sind verschiedene Topoisomerasen in Pro,- und Eukaryonten differenziert worden. Grundsätzlich werden sie in zwei Subfamilien eingeteilt, Topoisomerasen Typ I DNA und Topoisomerasen Typ II DNA. Die Einteilung erfolgt je nachdem ob ein Einzel oder Doppelstrangbruch induziert wird.

Die Topoisomerasen Typ I DNA bewirken somit Einzelstrangbrüche und ermöglichen der DNA eine Relaxation mit anschließender Wiederverknüpfung der DNA- Stränge. Beispielhaft vertreten wird diese Gruppe durch die E. Coli und die eukaryotische DNA-Topoisomerase Typ I.

Die Typ II Topoisomerasen bewirken vorübergehende Doppelstrangbrüche, womit sie das Überkreuzen der doppelsträngigen DNA-Segmente katalysieren und diese nach Korrektur wieder miteinander verbinden. Beispielhaft wird diese Gruppe durch die E. Coli Gyrase oder die eukaryotische Topoisomerase Typ II vertreten (Liu et al. 1980, Cozzarelli 1980, Gellert, 1980).

### Unterschiede zwischen der humanen DNA- Topoisomerase I und II

Allgemein lässt sich der Reaktionsmechanismus beider Enzymgruppen in einen fünfstufigen Prozess einteilen:

- Anlagerung des Enzyms an die DNA
- Spaltung eines oder beider DNA- Stränge
- Durchtritt eines DNA Abschnittes durch die entstandene Lücke
- Wiederverknüpfung der Bruchstelle
- Dissoziation der Topoisomerase von ihrem Substrat

Es gibt dennoch deutliche Unterschiede zwischen den zwei Enzymgruppen:

Bei der Typ I Topoisomerase handelt es sich um ein monomeres Protein, dass die Fähigkeit hat, sowohl positiv als auch negativ superspiralisierte DNA zu relaxieren. Hierfür benötigt der Typ I kein energiereiches Coenzym. Er lagert sich bei der Umsetzung an die DNA an und bildet gemeinsam den sog. „non cleavable complex“.

Der „non cleavable complex“ steht im Reaktionsgleichgewicht mit dem sog. „cleavable complex“. Beim „cleavable complex“ handelt es sich um einen Zustand, bei dem ein Einzelstrang der DNA durchtrennt wird und die Topoisomerase über eine kovalente Tyrosyl- Phosphat- Bindung mit dem 3- Phosphorylende des zerschnittenen DNA Stranges in Verbindung steht.

Eine Änderung der DNA-Topologie aus diesem „cleavable complex“ erfolgt dadurch, dass der intakte DNA Einzelstrang durch die Bruchstücke des komplementären geführt wird. Anschließend werden die beiden Einzelstrangbruchenden wieder zusammengefügt. Nun dissoziiert das Enzym von der Helix oder beginnt einen weiteren Reaktionszyklus (Schneider et al. 1990).

Die DNA-Topoisomerase II, aufgebaut aus zwei identischen Untereinheiten, kommt in Form von DNA-Topoisomerase II<sub>α</sub> und II<sub>β</sub> vor

(Tan et al. 1992). Sie unterscheiden sich durch biochemische und pharmakologische Eigenschaften. Jedoch katalysieren sie beide eine Reihe von ATP-abhängigen Veränderungen in der DNA-Topologie, die Relaxation superspiralisierter DNA sowie Verkettungs- und Entkettungsreaktionen ringförmiger DNA-Moleküle (Liu et al. 1980).

Später konnten Liu et al. bei diesem, dem Topoisomerase-I ähnlichen Katalysevorgang, einen „non cleavable complex“, sowie einen „cleavable complex“ als Zwischenprodukt identifizieren (Liu et al. 1983).

#### **1.4.2.2 Biologische Funktion der Topoisomerasen**

Für eine erfolgreiche DNA-Replikation ist mindestens eine Typ I- oder eine Typ II-Topoisomeraseaktivität erforderlich (Brill et al. 1987). Darüber hinaus ist bei der Mitose für die Trennung der komplett replizierten Tochterchromosomen die Topoisomerase-II unersetzlich (DiNardo et al. 1984). Es konnte durch Untersuchungen an den Hefezellen eine Beteiligung der Topoisomerasen bei dem Transkriptionsvorgang gezeigt werden (Brill et al. 1987).

Im Vergleich unterscheiden sich die Topoisomerasen nicht nur in ihrer Funktion, sondern auch in ihrem Regulationsmechanismus. Während die Topoisomerase II eine zyklusabhängige Aktivität je nach Wachstumszustand der Zelle aufweist, ist bei der Topoisomerase I keine solch ausgeprägte Zellzyklusabhängigkeit feststellbar. Hier variiert die Enzymaktivität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (Heck et al. 1988, Hwang et al. 1989).

Untersuchungen von SULLIVAN et al. zeigten eine weitgehende Aufhebung der zellzyklusabhängigen Aktivität der Topoisomerase II bei den entarteten Zellen. Hier bleibt die Aktivität auf einem konstant hohen Level und ist kaum durch äußere Bedingungen beeinflussbar (Sullivan et al. 1987).

Vergleichende Studien an Kolonkarzinomgewebe von GIOVANELLA et al. zeigten eine Erhöhung der Topoisomerase I-Aktivität parallel mit ansteigendem Malignitätsgrad (Giovanella et al. 1989).

### 1.4.2.3 Topoisomeraseinhibitoren

Prinzipiell kann man alle bekannten Topoisomeraseinhibitoren trotz ihrer strukturellen Unterschiede in zwei Wirkungsgruppen unterteilen. Die zuerst entdeckte Substanzklasse sind die Topoisomerasegifte. Sie sind in der Lage das Wiederzusammenfügen der DNA-Bruchstränge durch die Topoisomerasen zu blockieren. Dadurch stabilisieren sie die DNA-Bruchstränge und die Formation des „cleavable complex“ (Sehested et al. 1996). Einige Vertreter dieser Gruppe sind die Topoisomerase I- oder II-Inhibitoren Camptothecin, Etoposid oder Daunorubicin.

Camptothecin gehört zu den ersten entdeckten selektiven Giftstoffen der Topoisomerase I, die in der klinischen Anwendung mit hohen Nebenwirkungen verbunden sind. Bereits 1966 stellten Wall et al. bei Pflanzenextrakten aus *Camptotheca accuminata* eine starke antitumorale Wirkung an vielen soliden Tumoren fest, die ebenfalls hohe toxische Nebenwirkungen zeigten. Nach diversen strukturellen Veränderungen des Camptothecins konnte man abgewandelte Substanzen wie Topotecan und Irinotecan gewinnen, die neben einer hohen antitumoralen Wirkung im Vergleich geringere Nebenwirkungen aufweisen.

Untersuchungen von FERGUSON et al. und später BAGULEY et al. zeigten, dass die Topoisomerasegiftstoffe neben ihrem großen Einfluss auf die DNA-Organisation und Antitumorwirkung gegen die eukaryotischen Enzyme auch kanzerogene Eigenschaften besitzen (Ferguson et al. 1996 und Baguley et al. 1998).

Daraus resultierend stellen die Topoisomerasen in der modernen Medizin wirksame Substanzen in der Tumorbehandlung dar, die jedoch durch

ihren Wirkungsmechanismus selbst ein malignominduzierendes Potential besitzen.

Die andere neue Gruppe von Topoisomerasehemmstoffen, die keine typische Formation von „cleavable complex“ und DNA-Strangbrüchen zeigt wird als katalytischer Topoisomerase-Inhibitor bezeichnet. Unter Einfluss dieser Substanzen bleiben die Topoisomerasen inaktiv und können die DNA nicht angreifen, da sie bereits vor Beginn ihres katalytischen Zyklus gehemmt werden (Capranico et al. 1997).

Darüber hinaus sind diese Substanzen in der Lage aufgrund ihres frühen Eingreifens in den Reaktionszyklus der Topoisomerasen, die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch die typischen Giftstoffe zu verhindern (Benchokroun et al. 1995).

Im Vergleich zu Topoisomerasegiften weisen sie geringere Nebenwirkungen auf und stellen dadurch und durch ihre hohe antitumorale Wirkung neue Therapieoptionen für die Zukunft dar.

Auch die Boswelliasäuren scheinen einen ausgeprägten zytotoxischen Effekt zu besitzen, der aller Wahrscheinlichkeit nach auf einer Hemmung der beiden Topoisomerasen beruht. Ihr mildes Nebenwirkungsprofil spricht dafür, dass sie eher zu den katalytischen Topoisomerase-Inhibitoren gehören (Heldt et al. 1997).

## 2. Problemstellung

Die Inzidenz der intrakraniellen Tumoren und besonders der Gliome ist seit Anfang der 60 er-Jahre gestiegen. Die Auswertung von Daten sechs ausgewählter Industrienationen aus den Jahren zwischen 1968 und 1987 ergab, dass sich in allen untersuchten Staaten (Deutschland, England, Italien, Japan und den USA) die Hirntumorraten in der Bevölkerung zwischen 65 und 74 Jahren annähernd verdoppelten, während sie in der Gruppe der 75-84jährigen sogar um mehr als das Zweifache anstiegen (Davis et al. 1990). Trotz enormer Fortschritte der modernen Medizin ist die Therapie von malignen Gliomen noch unbefriedigend. Insbesondere konnten im Bereich der adjuvanten Chemotherapie bis heute nur wenige Erfolge erzielt werden. Zunehmend wird nach ergänzenden Behandlungen gesucht, die zu einer Überlebenszeit-Verlängerung der Gliompatienten führen.

Das Glioblastoma multiforme wird typischerweise von einem ausgeprägten peritumoralen Hirnödem umgeben. Dies führt zur Erhöhung des intrakraniellen Druckes mit schweren Hirndrucksymptomen und kann darüber hinaus durch Hirnstammquetschung nach Herniation zum Tod führen (Lordo et al. 1989, Ohnishi et al. 1990). An der Entstehung des Hirnödems sind Cysteinyl-Leukotriene, die von dem Tumor selbst in großen Mengen synthetisiert und sezerniert werden, pathophysiologisch beteiligt (Simmet et al. 1990, Winkig et al. 1997).

Als möglicher therapeutischer Ansatz in der Behandlung maligner Gliome wäre die 5-Lipoxygenase als Schlüsselenzym für den Leukotrienstoffwechselweg ein geeigneter Angriffspunkt.

Boswelliasäuren aus dem Harz des indischen Weihrauchs weisen ein ausgeprägtes 5-Lipoxygenase-inhibierendes Potential auf und besitzen die notwendigen strukturellen Voraussetzungen zur Permeation über die Blut-Hirn-Schranke.



Hinsichtlich der Wirkung der Boswelliasäuren auf die malignen Gliome wurde bereits im Vorfeld durch Studien eine Verminderung des perifokalen Ödems und Verbesserung der klinischen Symptome bei Patienten nachgewiesen (Boecker et al. 1997). Darüber hinaus wurden konzentrationsabhängige, zytotoxische Effekte auf Gliomzelllinien durch isolierte Boswelliasäuresubtypen durch Hemmung der Topoisomerasen in vitro beobachtet (Heldt et al. 1997).

Unterstützend zu früheren Studien über die Wirkung der Boswelliasäuren war das Ziel dieser Arbeit, in einer experimentellen Studie quantitative Daten über die Wirkung der Boswelliasäuren auf maligne Gliome in vivo zu gewinnen.

Das Ziel war es, eine signifikante konzentrationsabhängige Überlebenszeitverlängerung der tumorimplantierten Ratten durch die Behandlung mit einem Extrakt aus Boswelliasäuren zu untersuchen. Des Weiteren sollte eine Verbesserung des klinischen Zustandes der Tiere durch die Behandlung mit Boswelliasäuren anhand einer Vitalitätsskala evaluiert werden.

Für die Tierversuche lag eine Genehmigung der aufsichtsführenden Tierschutzbehörde beim Regierungspräsidium Gießen vor.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 C6 – Tumorzellkulturen

Bei der vorliegenden Studie wurde zur Implantation eine C6-Zelllinie von Rattenastrozytomen (amerikanischer Zellkultur Typ) verwendet. Die Zelllinie geht zurück auf einen glialen Rattentumor, der in vivo durch Injektion von N-Nitroso-N-Methylharnstoff induziert wurde (Benda et al. 1968).

Zur Herstellung des Nährmediums wurden 500 ml D - MEM Nährmedium (Gibco:D-M. EM Bestell.-Nr.: 218M - 025) mit 50 ml fetalem Kälberserum (Gibco: 70270 - 106), 1 ml Penicillin/Streptomycin (PAA: P11 - 010), 3 ml L-Glutamin (Gibco: 25030 - 024) (Bestandteile steril filtriert) versetzt.

Die Zellen wurden in Portionen von jeweils  $10^{11}$  Zellen (= 1 Million Zellen) zwischen Passage 68 und 77 im Nährmedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Mindestens fünf Tage vor Inokulation wurden sie aufgetaut und in eine mit 20 ml Nährmedium gefüllte Kulturflasche gegeben. Diese wurde im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

24 Stunden nach dem Auftauen wurde das Nährmedium gewechselt; ab dem zweiten Tag je nach Zustand des Zellwachstums wurden die Zellen passagiert. Zu diesem Zweck wurde das Medium abgesaugt, einmal mit Phosphat-Puffer gewaschen (POS, Gibco: 14040 - 091) und dann die Zellen mit Trypsin/EDTA (Gibco. 25300 - 054) 5 Minuten behandelt, bis die Zellen sich vom Flaschenboden abgelöst hatten. Die entstandenen Zellsuspensionen wurden in Zentrifugen-Röhrchen umgefüllt, jeweils 20 ml Nährmedium zugegeben, gut durchmischt, dann abzentrifugiert. Danach wurden die Überstände abgesaugt, die Zellsedimente wurden mit frischem

Medium in drei neue Kulturflaschen gegeben und im Brutschrank weiter inkubiert.

Zur Inokulation wurden Zellen zwischen Passage 72 und 88 verwendet. Nach Absaugen des Mediums und Ablösen der Zellen vom Flaschenboden mittels 2 ml Trypsin/EDTA wurde die entstandene Suspension in ein Gefäß mit 13 ml Nährmedium gegeben und gut durchmischt. Im Anschluß abzentrifugiert und mit 10 ml frischem Medium die Zellsedimente resuspendiert.

Hieraus wurden 100 µl mit derselben Menge Trypanblau plus 800 µl PBS abpipettiert vermischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop konnte so die Zellzahl bestimmt und die Vitalität der Zellen überprüft werden. Zu den durch Zentrifugieren (5 min bei 1000 U/min) und Abkippen des Überstandes gewonnenen reinen C6-Zellen wurde soviel phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) gegeben, dass die nach sorgfältiger Durchmischung entstandene Zellsuspension pro Mikroliter  $2 \times 10^4$  Zellen (= 20.000 Zellen) enthielt. Davon wurden jeder Ratte 5 µl - entsprechend  $10^5$  Zellen inokuliert.

Alle Reagenzien, die mit den C6-Zellen in Kontakt kamen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Alle Arbeitsschritte bei denen die Kulturflaschen geöffnet werden mussten wurden unter der Sicherheitswerkbank vorgenommen.

### 3.2 Instrumente

Als Injektionsinstrument wurden Hamilton-Spritzen verwendet. Diese MICROLITER®-Spritzen sind Standard- Messinstrumente für genaues dosieren von Flüssigkeiten im Nennvolumenbereich von 0,5 bis 500 µl. Die Genauigkeit der Spritzen beträgt  $\pm 1\%$  des Nennvolumens.

**Abbildung 4: Hamilton- Spritze**



3 Hamilton-Spritzen.  
*von vorn nach hinten:*  
2 µl, 25 µl, 250 µl.

Die Hamilton-Spritzen wurden nach der Füllung in den Haltearm eines stereotaktischen Kopfhalteapparates eingespannt.

Das stereotaktische Kleintierinstrument wurde 1963 von der Firma DAVID KOPF INSTRUMENT entwickelt. Das vielseitig einsetzbare Instrument erleichtert eine geeignete Fixierung der Kleintiere zu den stereotaktischen Einsätzen verschiedener Geräte.

Das präzise Ausrichten der Fixierungsspannen ermöglicht einen glatten Bewegungsablauf und eine genaue Positionierung des Objektes. Das Instrument besteht aus einem stabilen U-förmigen Rahmen mit einem nach lateral, vertikal und anterior-posterior beweglichen Haltearm, der sich mittels Schrauben regulieren lässt. Die Ratten werden mittels befestigter Zahnhaltespannen an den Rahmen und zwei seitlichen Metallstäben für die Ohren positioniert.

Der Rahmen ist an einer 10X14 cm großen Basisplatte befestigt und zum besseren Einbringen der Ohrenstäbe bei der Fixierung der Tiere um 50 mm erhöht.

**Abbildung 5: Das stereotaktische Kleintierinstrument**



### **3.3 Implantationstechnik**

Für die Studie wurden erwachsene weibliche Wistar Ratten mit einem Gewicht zwischen 220 und 250 g verwendet.

Als Narkosemittel wurde Phenobarbital verwendet. Die Tiere wurden unmittelbar vor dem Eingriff mit einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal appliziert, unter Narkose gesetzt. Dadurch konnte eine ausreichende Sedierung der noch spontan atmenden Tiere erzielt werden.

Anschließend wurde der Kopf der Tiere in einem stereotaktischen Kopfhalteapparat (David Kopf Instrument) fixiert. Dabei wurden die prominenten Vorderzähne in der am Rahmen vorinstallierten Zahnhaltespange eingehakt und mittels Befestigungsschrauben festgehalten. Nach Positionierung des Kopfes wurden die seitlichen Ohrstäbe in den rechten und linken Meatus acusticus Externus eingeführt

und durch Befestigungsschrauben am Rahmen fixiert. Nach Kopfrasur und Hautdesinfektion erfolgte ein ca. 1 cm langer, sagittaler Hautschnitt entlang der Mittellinie und sorgfältige Freipräparation der Schädelkalotte.

Vor der Tumordinjektion mit der Hamilton-Spritze wurde unter sterilen Bedingungen mittels einer Injektionskanüle der Stärke 0,40 x 20 mm manuell eine Bohrung des Schädelknochens durchgeführt. Dabei wurde das Bohrloch 3 mm rechts lateral und 1 mm anterior zum Bregma positioniert (Nobuhisa et al. 1993)

Die bereits mit 5µl von C-6-Tumorsuspension ( $10^5$  Zellen) gefüllten Hamilton-Spritzen wurden im Haltearm des stereotaktischen Apparates eingespannt und befestigt. Mittels der Regulierungsschraube des Haltearms wurde die Spritze nun in das bereits vorliegende Bohrloch eingeführt.

Die Injektionstiefe betrug bei der Implantation ca. 5 mm von der Tabula externa. Die Einführung der Hamilton-Spritze wurde durch die Skalierung der Haltearmbewegungsschraube des stereotaktischen Apparates kontrolliert.

Nach Erreichen der Implantationstiefe erfolgte die manuelle Injektion der C-6-Suspension in einer Zeitspanne von fünf Minuten. Die Rückführung der Hamilton-Spritze nach der erfolgreichen Injektion der Tumorzellen erfolgte mit einer Geschwindigkeit von ca. 1mm/min. Dadurch sollte ein Rückfluss der injizierten Tumorzellen in den Nadeltrakt vermieden werden. Das Bohrloch wurde anschließend nach Entfernen der Nadel mit Knochenwachs verschlossen. Nach sorgfältiger Spülung des subgalealen Raumes mit steriler Kochsalzlösung wurde die Wunde mittels fortlaufender Naht mit Silicon-Faden der Stärke 3-0 verschlossen.

Alle Ratten wurden bis zum ausreichenden Abklingen der Narkose beobachtet und erst nach Rückkehr der Orientierung und der normalen Beweglichkeit wieder in ihre ursprünglichen Gruppen zurückgesetzt.

### **3.4 Applikation H15-Extrakt**

Nach Abschluss der Implantationsphase erfolgte ein vierzehntägiges Intervall vor dem Behandlungsbeginn. Innerhalb dieser behandlungsfreien Zeit wurde eine Proliferation der C6-Zellen und Entwicklung einer Tumormasse ermöglicht.

Zur Therapie der Tiere wurde das Präparat H15 Ayuromedica verwendet. H15 Ayurvedica sind Tabletten, die je 400 mg Trockenextrakt (Olibanum extractum siccum) aus *Boswellia serrata* enthalten (siehe Kapitel H-15 1.3.4).

Das in der vorliegenden Studie applizierte Medikament, geliefert in Form von 400 mg Tabletten von der Firma Pharmasan Freiburg wurde vor der Anwendung mittels eines Mörsers pulverisiert. Aus dem gewonnen Pulverextrakt wurden drei verschiedene Dosisgruppen, 60mg, 120mg und 240 mg gebildet.

Die Medikamentenapplikation erfolgte oral. Für die Vereinfachung der Medikamentenverabreichung und eine effektivere Aufnahme wurden die Pulverextrakte immer kurz vor der Applikation sorgfältig im 0,5 ml Wasser gelöst. Anschließend erfolgte die Applikation mittels einer Schlundsonde.

Die Versuchstiere wurden dabei an ihrem Nackenhautmantel fest gegriffen und hochgehalten. Dadurch wurden die Tiere in Ihrer Beweglichkeit eingeschränkt. Nun konnte der Inhalt der Pipette oral im vorderen Rachenabschnitt appliziert werden. Nach einer kurzen Beobachtung der Tiere in noch gehaltener Position und Sicherstellung der Medikamentenaufnahme wurden sie wieder in ihre Gruppe zurückgesetzt. Die hier beschriebene Verabreichungsform des Medikamentes erfolgte bei allen Tieren in gleicher Weise.

Die Medikamentenapplikation fand vierzehn Tage nach der Tumorimplantation statt. Hierbei wurden die Tiere dreimal täglich in einem

achtstündigen Zeitintervall behandelt. Täglich erfolgte die erste Applikation zwischen 6:00 bis 6:30 Uhr, gefolgt von der zweiten Verabreichung um 14:00 bis 14:30 Uhr und der dritten zwischen 22:00 bis 22:30 Uhr.

### **3.5 Versuchstiere**

Für die Versuche wurden weibliche Wistar Ratten verwendet. Alle 40 Tiere wurden mit  $10^5$  C6-Gliomzellen stereotaktisch implantiert. Wir bildeten drei Therapiegruppen mit jeweils 240mg/kg, 120mg/kg und 60mg/kg-Körpergewicht H15-Extrakt, sowie eine unbehandelte Kontrollgruppe. Die Gruppen wurden randomisiert und bestanden aus je 10 Ratten.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen mit fünf Tieren pro Makrolonkäfig mit einer Größe von 45cm\_60cm\_25cm. Die Tiere wurden in einem Licht-/ Dunkelrhythmus im Zwölf-Stunden-Wechsel (Licht von 6.00 bis 18.00 Uhr) und bei einer Raumtemperatur von 22°C gehalten. Zweimal wöchentlich wurden die Tiere in saubere Käfige umgesetzt.

#### **Körpergewicht/ Fress- und Trinkverhalten**

Zur Evaluation des Körpergewichtes als Vergleichsparameter wurden die Ratten seit Beginn des Versuches täglich um 14:00 gewogen. Die Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein Gewicht zwischen 220 und 250 Gramm. Während der gesamten Studie wurden alle Tiergruppen unter gleichen Bedingungen gehalten und mit der gleichen Menge an Nahrung gefüttert.

Das Fütterverhalten der Tiergruppen wurde ebenfalls täglich beobachtet und dokumentiert. Spezialfutter für Ratten und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung.



### ***3.6 Vitalitätsanalyse und klinischer Status***

In der vorliegenden Studie haben wir neben dem Einfluss der Boswelliasäuren auf die Überlebenszeit der tumorimplantierten Ratten auch ihre Vitalität und ihr Gewicht im Verlauf der Behandlung beobachtet. Während der gesamten Studie wurde das klinische Verhalten aller Versuchsgruppen täglich dokumentiert.

Für die Beurteilung und Analyse des klinischen Status wurde eine Vierpunkteklassifikation entwickelt. Dabei waren die Kriterien am Normalverhalten von gesunden Wistar Ratten orientiert. Die Klassifikationsskala war zusammengesetzt aus:

- Fluchtreaktion der Tiere
- Aggressivität der Tiere
- Bewegungsgeschwindigkeit der Tiere
- Motorische Defizite der Tiere z.B. Paresen

Hierbei wurden das Minimalverhalten mit einem Punkt und das Maximum mit vier Punkten bewertet. Resultierend erhielten die Tiere mit annähernd normalem klinischem Verhalten sechzehn Punkte und Tiere mit dem auffälligsten pathologischen Verhalten nur vier Punkte.

Die nachfolgende Tabelle stellt die Vitalitätsparameter für die Verhaltens-Klassifikation der Ratten während der Behandlungsphase dar.

**Tab. 5: Parameter zur Berechnung des Vitalitätsindex**

<u>Fluchtreaktion</u>		<u>Bewegungsschnelligkeit</u>	
Normal	4	Normal	4
Verspätet	3	Leicht verlangsamt	3
Verlangsamt	2	Deut. Verlangsamt	2
Keine	1	Keine	1

<u>Motorische Defizite</u>		<u>Aggressivität</u>	
Keine	4	Normal	4
Leicht	3	Verspätet	3
Mäßig	2	Verlangsamt	2
Stark	1	Keine	1

**Kriterien bei der Erhebung der Verhaltens-Klassifikationsparameter:**

Die Erhebung der oben genannten Parameter zur Verhaltens-Klassifikation basierte auf den im folgenden beschriebenen, täglich dokumentierten Beobachtungen. Jeder Kategorie wurden bestimmte Verhaltensmuster zugeordnet. Die Bewertung der Verhaltensqualität erfolgte wie beschrieben in 4 Stufen:

**Fluchtreaktion:**

Hierbei wurde die Abweichreaktion der Ratten beim täglichen Fangversuch zur oralen Medikamentenapplikation bewertet.

Als zweites Verhaltensmuster in dieser Kategorie wurde das Aufrichten der Ohren und des Oberkörpers (Männchen machen), sowie aufmerksames Beobachten der Umgebung, beim Betreten des Raums und Erzeugen von Geräuschen dokumentiert.

**Aggressivität:**

Das Aggressionsverhalten wurde einerseits gegenüber dem Menschen und andererseits innerhalb der Gruppe beobachtet und bewertet. Beim Versuch die Tiere zu fangen sträubten sie das Nackenfell, schauten mit aufgerichtetem Kopf und geöffnetem Maul. Darüber hinaus wurde das Beißverhalten der Tiere beim Festhalten dokumentiert.

Innerhalb der Gruppe wurde das Aggressionsverhalten durch regelmäßige Rankämpfe bestimmt.

**Bewegungsschnelligkeit:**

Diese Eigenschaft wurde anhand des Putzverhaltens und des Herumtobens der Tiere im Käfig bestimmt. Darüber hinaus wurde das Fütterverhalten und knabbern am Käfiggitter bewertet.

**Motorisches Defizit:**

Die Bewertung der motorischen Defizite der Ratten konnte anhand des Gehverhaltens am ehesten beurteilt werden. Hier wurden Gangstörungen durch Monoparesen, Hemiparesen, Paraplegien etc. dokumentiert. Weiterhin wurden Koordinationsstörungen in den Bewegungsabläufen und das Orientierungsverhalten bewertet.

**3.6.1 Datenanalyse und Auswertung**

Die Auswertung der Daten und die statistische Analyse wurde in der vorliegenden Studie mit Hilfe des Student's t-Testes für paarige und unpaarige Stichproben ermittelt. Die statistischen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (standard error of the mean) angegeben.

Zum Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen wurde die Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse genutzt. Das Verfahren von Kaplan und Meier benutzt statt konstanter Intervalle (z.B. 1 Woche)

unterschiedlich lange Intervalle und zwar genau so, dass jeder Todesfall am Ende eines Intervalls liegt.

Mit Hilfe des Log rank Testes wurde die Überlebenszeit der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen berechnet. Die statistische Signifikanz wurde hier mit einer Wahrscheinlichkeit von kleiner als 5% angenommen ( $P < 0,05$ ).

Die in der vorliegenden Studie beschriebenen Tierversuche wurden streng nach den Richtlinien des Deutschen Tierschutzbundes durchgeführt. Eine Genehmigung der aufsichtsführenden Tierschutzbehörde beim Regierungspräsidium der Stadt Gießen lag vor.

### ***3.7 Entnahme des Gehirns zum Tumornachweis***

Zur Entnahme des Gehirns wurde die Kalotte der Ratten weitgehend von Haut befreit. Mittels einer Hohlmeißelzange wurde die Schädeldecke von kaudal her in kleinen Stückchen abgetragen, bis das gesamte Gehirn betrachtet werden konnte. Mittels eines Raspatoriums wurde das Gehirn der Tiere sorgfältig entnommen. Anschließend wurden sie in Kunststoffbehälter verpackt, im flüssigen Stickstoff tiefgekühlt und bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur makroskopischeun Beurteilung des Tumorwachstums wurden histologische Schnitte angefertigt.

## 4. Ergebnisse

Um die Wirkung der Boswelliasäuren auf die vorhandene Tumormasse zu untersuchen wurde vierzehn Tage nach der Implantation der C6-Zellen mit der Behandlung der Therapiegruppen begonnen. Innerhalb dieses behandlungsfreien Intervalls von 14 Tagen konnten die C6-Zellen zu einer Tumormasse wachsen.

Als Vergleichsparameter wurden neben der Überlebenszeit der tumorimplantierten Ratten, ihre Vitalität (Fluchtreaktion, Bewegung, Aggressivität, Motorik) und ihr Gewicht im Verlauf der Behandlung beobachtet.

### 4.1 Vitalitätsindex

#### 4.1.1 Vitalitätsindex vor Implantation

Die hierfür entwickelte Vierpunktklassifikation setzte sich aus Fluchtreaktion, Aggressivität, Bewegungsgeschwindigkeit und Paresen der Tiere zusammen. Vor Beginn der Studie konnte bei allen Tieren ein Vitalitätsindex von 16 beobachtet werden.

Die Ratten zeigten ein ausgeprägtes, normales Fluchtverhalten bei der täglichen Fütterung. Die Vigilanz war bei allen Ratten unbeeinträchtigt, sowohl beim Betreten des Raumes als auch beim Klopfen an die Käfiggitter zeigten die Ratten ein nahezu identisches Fluchtverhalten.

Bezüglich der Aggressivität konnten wir bei allen Tieren ein natürliches Muster feststellen, d.h. beim Fangversuch, in die Käfigecke getrieben, wiesen die Ratten ein Drohverhalten durch aufgestellte Nackenhaare, aufgerichteten Kopf und geöffnetes Maul auf. Das Beißverhalten der Tiere war in Kraft und Dauer stark ausgeprägt. Auch untereinander wurden regelmäßige Rangkämpfe beobachtet.

Die Bewegungsschnelligkeit der Ratten war vor Beginn des Versuches nicht beeinträchtigt. Ein regelmäßiges Putzverhalten mehrmals am Tag war zu sehen. Darüber hinaus bewegten sich alle Gruppen nach der Fütterung schnell zur Futterstelle. Häufig knabberten sie an den Käfiggittern.

Motorische Defizite konnten vor Beginn des Versuches bei keiner der Gruppen festgestellt werden. Alle Tiere zeigten ein normales Gangverhalten und regelrechte Koordination.

#### **4.1.2 Vitalität 7 Tage nach Implantation bis 7 Tage nach Behandlungsbeginn**

In der ersten Woche nach Tumorimplantation konnte keine wesentliche Abweichung des Vitalitätsindex von 16 beobachtet werden. Während dieser 7 Tage kam es als Folge der Narkose anfänglich zu einer temporären Herabsetzung der Vitalität bei allen Versuchstieren.

Eine Woche nach Tumorimplantation bis eine Woche nach Beginn der Behandlung war ein nahezu gleicher Abfall des Vitalitätsindex bei allen Tiergruppen festzustellen. Beginnend mit einem Index von 16 Punkten konnte ein Abfall auf im Mittel  $11,38 \pm 0,47$  Punkte pro Tiergruppe 7 Tage nach Behandlungsbeginn gemessen werden. Die Tiere zeigten vor allem einen deutlichen Abfall der Vitalität in den Bereichen Fluchtreaktion, Bewegungsschnelligkeit und Aggressivität. Motorische Defizite konnten im beschriebenen Frühstadium nicht beobachtet werden. Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigte im Vergleich zu den Behandlungsgruppen keine signifikanten Abweichungen ( $p > 0,05$ ). Auch bei diesen Tieren fiel der Vitalitätsindex um 4-5 Punkte.

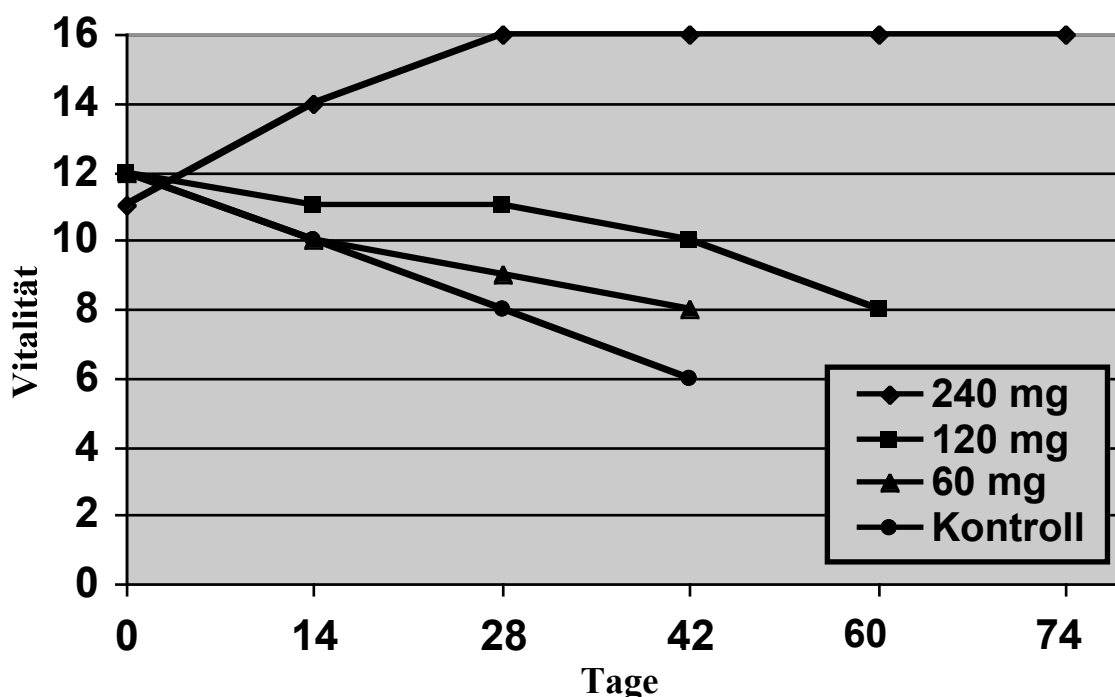
Der Abfall des Indexes stellte sich 7 Tage nach Behandlungsbeginn wie folgt dar:

- Fluchtreaktion: Die Ratten wiesen bei der täglichen Medikamentenapplikation eine anfangs verspätete bis verlangsamte Fluchtreaktion auf. Der Index wurde hier im Mittel auf  $2 \pm 0,47$  Punkte herabgesetzt.
- Bewegungsschnelligkeit: Hier konnte lediglich eine leichte Verlangsamung bei der täglichen Fütterung beschrieben werden. Das Putzverhalten war hier ebenfalls leicht herabgesetzt. Insgesamt wurde der Vitalitätsindex mit einem Mittelwert von  $3 \pm 0,66$  Punkten bewertet. Lediglich in der Kontrollgruppe bzw. der Gruppe, welche mit 60mg/KG Bosellia-Extrakt behandelt worden war, konnte eine minimal herabgesetzte, im Vergleich nicht signifikante ( $p > 0,05$ ), Verlangsamung der Bewegung festgestellt werden.
- Aggressivität: In diesem Bereich konnten wir eine verspätete bis verlangsamte Reaktion in der Aggressivität gegenüber dem Menschen im Gegensatz zu vorher feststellen. Das Beißverhalten der Tiere setzte verlangsamt ein und war in den Qualitäten Kraft und Dauer deutlich herabgesetzt. Hier ergab sich ein Mittelwert von  $2,5 \pm 0,70$ .
- Motorische Defizite: Im Bereich der Paresen konnten keine motorischen Defizite festgestellt werden. Die Vitalität wurde hier mit 4 Punkten  $\pm 0$  bewertet.

#### **4.1.3 Vergleich der Vitalität ab dem 7. Tag nach Behandlungsbeginn**

Erst nach ca. 1 Woche nach Behandlungsbeginn der Tiergruppen mit Boswelliasäuren konnten deutliche Unterschiede in deren Vitalitätsindex

beobachtet werden. Im Verlauf der Behandlung kam es in der Gruppe mit der höchsten Dosierung mit 240mg/kg KG zu einer Verbesserung des Vitalitätsindex, wohingegen in den anderen Gruppen ein weiterer Abfall der Vitalität zu beobachten war. Des Weiteren stellten wir im Vergleich einen langsameren Abfall der Vitalität in der Therapiegruppe mit 120mg/kg KG zu der Gruppe mit 60mg/kg KG oder der Kontrollgruppe fest. Nach 14 Tagen zeigte sich hier bereits ein Unterschied in der Vitalität von  $11 \pm 0,81$  (120 mg/kg KG) auf  $10 \pm 0,81$  (60 mg/kg KG) bzw.  $\pm 0,94$  (Kontrollgruppe).



**Abbildung 6: Behandlungsbeginn 14 Tage nach der Tumorimplantation mit verschiedenen Dosierungen. n=10 für jede Gruppe.**

Bei der oben gezeigten Abbildung wird von Tag 0, d.h. Beginn der Behandlung mit Boswelliasäuren 14 Tage nach Tumorimplantation, ausgegangen. Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben kam es sowohl eine Woche nach Implantation bis eine Woche nach Behandlungsbeginn zu keiner signifikanten ( $P > 0,05$ ) Vitalitätsveränderung der Gruppen untereinander. Der Index fiel, wie in der Abbildung 5 zu sehen bei allen Versuchsgruppen in nahezu gleicher Weise ab.



**Kontrollgruppe:**

Bei der Kontrollgruppe wurde bereits 2 Wochen nach Behandlungsbeginn ein deutlicher Abfall des Vitalitätsindex im Vergleich zu allen anderen Tiergruppen festgestellt. Ausgehend von einer Vitalität von 16 fiel dieser auf im Mittel auf 10 Punkte  $\pm 0,94$ .

Die Tiere zeigten eine deutliche Herabsetzung im Bereich ihrer Schnelligkeit (2 Punkte), der Aggressivität untereinander, als auch dem Menschen (2 Punkte) gegenüber. Das Fressverhalten nahm bei einigen Tieren der Gruppe ab, sie fraßen weniger und benötigten entsprechend längere Zeit (3 Punkte). Bei der Hälfte der Tiere zeigten sich bereits leichte Bewegungs- und Koordinationsstörungen (3 Punkte).

Bereits nach 14 Tagen verstarb die erste Ratte. Die noch lebenden Tiere zeigten nach 28 Tagen eine deutliche Herabsetzung des Indexes auf  $8 \pm 0,70$  Punkte. Hierbei waren v.a. deutliche Paresen mit Bewegungseinschränkungen der Extremitäten zu sehen. Bei den Tieren konnten kaum Abwehrreaktionen ausgelöst werden, das Fressverhalten war deutlich reduziert. Gruppenintern fanden sich diskrete Unterschiede in der Vitalität der Ratten. Die Parameter fielen auf jeweils  $2 \pm 0,70$  Punkte in der Vitalitätskala.

Im Verlauf fanden sich bei den Ratten der Kontrollgruppe insgesamt vermehrte Wundheilungsstörungen im Sinne von Infektionen, Eiterbildung und Nekrosen entlang der Nahtstelle.

Nach 42 Tagen war die Kontrollgruppe noch bestehend aus 1 Ratte in nahezu allen Parametern auf den niedrigsten Wert gesunken. Das noch lebende Tier bewegte sich kaum, die Spontanatmung war abgeflacht.

**Behandlungsgruppe mit 60mg/kg KG Boswellia-Medikamentenextrakt:**

Nach 14-tägiger Behandlung mit 60mg/kg KG Boswelliasäure-Extrakt war ein nahezu identischer Abfall wie bei der Kontrollgruppe festzustellen. Der Index fiel ebenfalls nach 14 Tagen auf  $10 \pm 0,81$  Punkte.

Erst nach 28 Tagen war ein diskreter Unterschied in einem einzelnen Parameter zu beobachten. Das Fluchtverhalten der Tiere wurde hier mit  $2,9 \pm 0,31$  Punkten bewertet, so dass die Vitalität  $8,9 \pm 0,94$  im Vergleich zur Kontrollgruppe  $8 \pm 0,70$  betrug.

Trotz der Behandlung entwickelten sich im Verlauf auch hier ähnlich wie bei der Kontrollgruppe Paresen und Koordinationsstörungen. Es fand ein verzögertes Reaktionsvermögen mit einem insgesamt geringfügig besseren Vitalitätsindex im Vergleich zur Kontrollgruppe statt. Auch hier konnte wie bei der Kontrollgruppe wegen des Versterbens der Tiere nur bis zum 45. Tag eine Verhaltensbeobachtung erfolgen. Es konnte keine signifikante Verbesserung des Vitalitätsindex beobachtet werden.

**Behandlungsgruppe mit 120mg/kg KG Boswelliasäure- Extrakt:**

Bei der Dosierung mit 120mg/kg KG konnte bereits nach 14 Tagen eine Besserung im Vitalitätsindex gemessen werden. Die wurde je mit 3 Punkten bewertet, nur die Fluchtreaktion wurde auf 2 Punkte herabgesetzt.

Im Vergleich zu den bereits beschriebenen Tiergruppen blieb der Index in den ersten 28 Tagen der Behandlung nahezu gleich bleibend bei  $11 \pm 1,20$  Punkten. Innerhalb der Gruppe waren Unterschiede im Index zwischen 9- bis 13-Punkte zu erkennen. Erst nach 42 Tage kam es zu einem sichtbaren Absinken des Indexes auf  $10 \pm 0,81$ . Die Tiere wiesen zusätzlich eine Verlangsamung in Ihrer Aggressivität auf (2 Punkte).

Insgesamt wurde hier eine Verbesserung der Vitalität und nur diskrete Wundheilungsstörungen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Die noch lebenden Tiere wurden bis zum 56 Tag überwacht und starben bei einer insgesamt besseren Vitalität. Auch diese Ergebnisse konnten statistisch nicht als signifikant bewertet werden.

#### **Behandlungsgruppe mit 240mg/kg KG Boswellia Medikamenten-extrakt:**

In dieser Gruppe mit der höchsten Medikamentendosis konnte ein signifikanter Unterschied in der Vitalität im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Die Ratten zeigten bereits nach 14 Tagen eine Verbesserung in der Bewegung, Aggressivität und der Fluchtreaktion auf im Mittel  $14 \pm ,047$  Punkte. In den Bewertungskriterien Bewegung und Aggressivität verbesserten sich diese Versuchstiere von 2 auf 3 Punkte. In den Fluchtreaktionen konnte keine Beeinträchtigung mehr festgestellt werden.

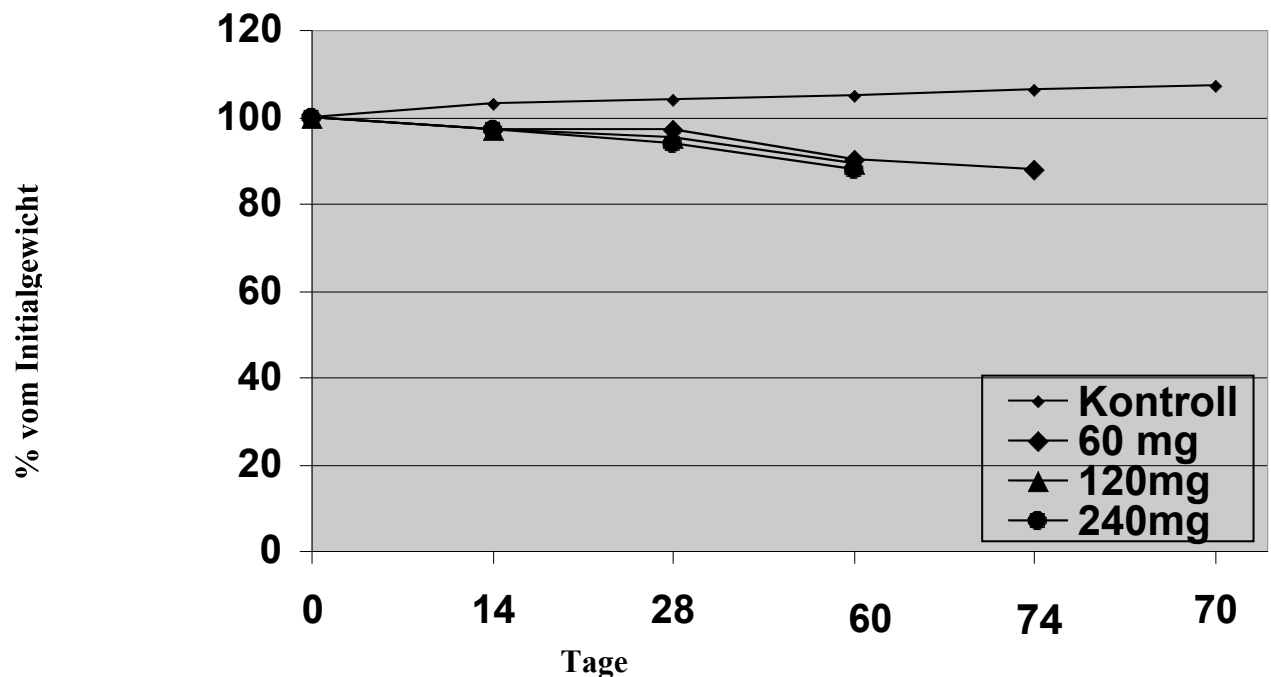
Die Vitalität der Tiere stieg innerhalb weiterer 14 Tage auf  $16 \pm 0$  Punkte. Hier konnte ein fast vollständiger Rückgang der Symptomatik festgestellt werden. Im Vergleich fanden sich lediglich in dieser Gruppe keine Wundheilungsstörungen oder Paresen. Auch bis zum Versuchsende am 74. Tag waren die Tiere in den genannten Parametern nicht eingeschränkt.

Ein weiterer Vergleichsparameter innerhalb der 4 Versuchsgruppen war die Evaluation des Gewichtes der Ratten, die im folgenden Kapitel ausgeführt wird.

#### ***4.2 Evaluation und Vergleich des Körpergewichtes***

Zu Beginn der Studie lag das durchschnittliche Gewicht der Versuchstiere bei  $241,98 \text{ g} \pm 2,02\text{g}$ . Im Verlauf des Versuches wurden die Tiere täglich

um die gleiche Uhrzeit gewogen. Die folgende Abbildung zeigt die Gewichtsveränderung der einzelnen Behandlungsgruppen:



**Abbildung 7: Veränderung des Körpergewichtes im Verlauf der Studie. n=10 für jede Gruppe. Behandlungsbeginn 14 Tage nach der Implantation mit verschiedener Medikamentendosis.**

In den einzelnen Gruppen stellte sich die Gewichtsveränderung wie folgt dar:

#### **Kontrollgruppe:**

Bei den Ratten der Kontrollgruppe kam es zu einem kontinuierlichen Abfall des Ausgangsgewichtes. Innerhalb der ersten 28 Tage verloren die Tiere fast 10% ihres Ausgangsgewichtes. Der Gewichtsabfall war zu Beginn ein rascherer, verglichen mit der Gruppe mit 60mg/kg, später jedoch annähernd identisch im Verlauf.

**Behandlungsgruppe mit 60mg/kg Boswellia- Medikamentenextrakt:**

Bei diesen Ratten konnte eine Abnahme des Körpergewichtes von initial durchschnittlich  $241,3 \pm 5,2\text{g}$  auf  $217 \pm 4,3\text{g}$  nach 42 Tagen ermittelt werden. Dies entspricht einer Gewichtsabnahme von ca. 10%.

**Behandlungsgruppe mit 120mg/kg Boswellia- Medikamentenextrakt:**

Auch bei dieser Gruppe wurde eine kontinuierliche Gewichtsabnahme ähnlich wie bei den anderen, zuvor beschriebenen Gruppen beobachtet. Anfänglich lag das Gewicht bei  $246,6 \pm 4,1\text{g}$  nach 56 Tagen bei  $225,3 \pm 6,3\text{g}$ .

**Behandlungsgruppe mit 240mg/kg Boswellia- Medikamentenextrakt:**

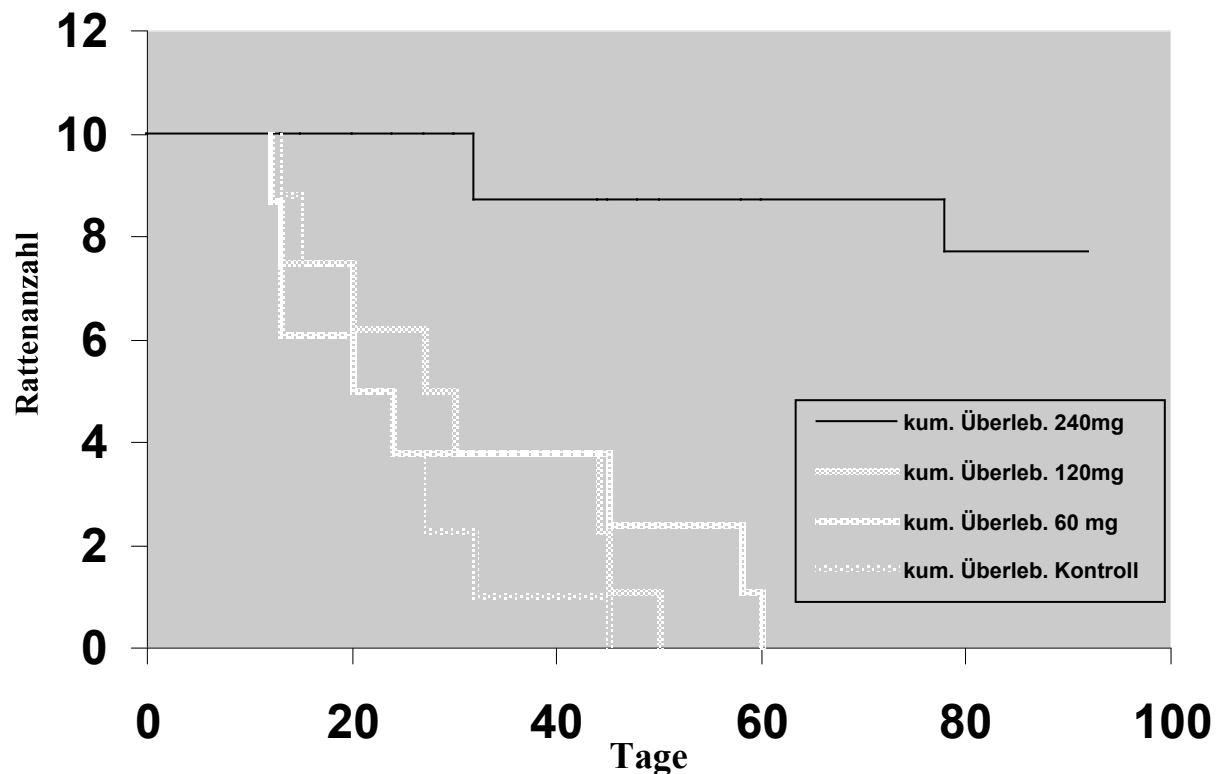
Lediglich bei dieser Versuchsgruppe kam es zu einer Zunahme des Körpergewichtes von durchschnittlich  $239,9 \pm 3,11\text{g}$  auf  $260,9 \pm 4,5\text{g}$ . Dies entspricht einer Gewichtszunahme von ca. 9% des Ausgangsgewichtes.

Die Gewichtszunahme der Gruppe 4 mit 240mg/kg auf ca. 109% des Ausgangsgewichtes ist als signifikant ( $P < 0.05$ ) anzusehen, wohingegen die Kontrollgruppe, sowie beide andere Gruppen etwa auf 90% des Ausgangsgewichtes abfielen.

***4.3 Evaluation und Vergleich der Überlebenszeit***

Der wichtigste klinische Parameter für die Wirkung der Boswelliasäuren auf die C6 Gliomzellen ist die Überlebenszeit der Ratten. Hierbei war der Vergleich der Überlebenszeit zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen im Verlauf der Behandlung entscheidend. Die

folgende Abbildung verdeutlicht die Überlebenszeit der Tiere der verschiedenen Gruppen:



**Abbildung 8: Vergleich der Überlebenszeit der Versuchsgruppen. Behandlungsbeginn 14-Tage nach der Tumorimplantation. Kaplan-Meier-Schätzung für kumulative Überlebenszeit zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe mit der höchsten Medikamentendosis ( $P < 0.05$ ).  $n=10$  für jede Gruppe.**

#### Kontrollgruppe:

Die Ratten der Kontrollgruppe starben im Durchschnitt innerhalb der ersten 4 Wochen nach Behandlungsbeginn. Das erste Tier starb bereits nach 14 Tagen, die Hälfte der Ratten verstarb bis zum 23. Tag unbehandelt. Die längste Überlebensdauer betrug 48 Tage. Die Tiere der Kontrollgruppe hatten den geringsten Vitalitätsindex, drei Tiere mussten präfinal aufgrund des schlechten Zustandes getötet werden. Die Ratten verstarben in einem insgesamt schlechteren Allgemeinzustand als die Behandlungsgruppen.

**Behandlungsgruppe mit 60mg/kg Boswellia- Medikamentenextrakt:**

Bei dieser Gruppe konnte eine minimale Verlängerung der Überlebenszeit um ca. 4% beobachtet werden. Das erste Tier verstarb nach 13 Tagen, die Hälfte der Ratten war wie in der Kontrollgruppe bis zum 23. Tag verstorben. Auch hier mussten drei Tiere aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes im praefinalen Zustand getötet werden. Die Tiere überlebten, bei einem geringfügig besseren Vitalitätsindex, im Durchschnitt nicht signifikant länger als die der Kontrollgruppe. Das letzte Tier starb nach 45 Tagen.

**Behandlungsgruppe mit 120mg/kg Boswellia- Medikamentenextrakt:**

Die Gruppe mit der mittleren Medikamentendosis überlebte im Vergleich zur Kontrollgruppe 23% länger. Das erste Tier verstarb nach 14 Tagen, die Hälfte der Ratten war bis zum 25.Tag tot. Die Überlebenszeit verlängerte sich um insgesamt 11 Tage, dass letzte Tier starb nach 59 Tagen. Hier konnte zwar eine Verbesserung der einzelnen Parameter erreicht, jedoch keine Signifikanz festgestellt werden. In dieser Gruppe musste lediglich ein Tier wegen des schlechten Zustandes getötet werden.

**Behandlungsgruppe mit 240mg/kg Boswellia- Medikamentenextrakt:**

Lediglich bei dieser Gruppe konnten wir eine signifikante Lebenszeitverlängerung feststellen. Die Versuchstiere mit der höchsten Medikamentendosis erreichten eine Überlebenszeit bis zu 96 Tagen, was einer Verdoppelung im Vergleich zur Kontrollgruppe entspricht. Das erste der Versuchstiere starb nach 32 Tagen, ein weiteres nach 78 bei insgesamt gutem Vitalitätsindex und steigendem Gewicht.

Insgesamt konnten wir bei der Betrachtung der Überlebenszeit der 4 Gruppen lediglich bei der Gruppe mit der höchsten Medikamentendosis eine signifikante ( $P < 0.05$ ) Überlebenszeitverlängerung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf das doppelte feststellen. Dies korreliert mit dem, in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen, verbesserten Vitalitätsindex und einer kontinuierlichen Gewichtszunahme.

#### ***4.4 Nachweis Tumorwachstum (makroskopischer Befund)***

Die Tumoren der unbehandelten Tiere sowie der Gruppe behandelt mit 60 mg/kg KG nahmen auf der Gehirnoberfläche ein räumliches Ausmaß von zumeist 0,8 cm in rostro-kaudaler und 0,75 cm in lateraler Ausrichtung ein. Die Neoplasmen waren äußerlich sowohl von rötlichen Einblutungen als auch von glasartiger Masse bedeckt. Einige Tumoren wiesen ausgeprägte zentrale Nekrosebezirke mit hochgradiger peripherer Gefäßbildung auf. Aufgrund des Raumfordernden Wachstums kam es zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Verschiebung der Mittellinie nach links.

Die räumliche Ausbreitung der Tumoren nahm in den Behandlungsgruppen mit 120 bzw. 240 mg/kg KG im Vergleich deutlich ab.



**Abbildung 9: Gehirnschnitt; makroskopische Ansicht von rostral. In der unbehandelten Tiergruppe zeigt der Tumor in der rechten Hemisphäre ein deutliches Wachstum.**



**Abbildung 10 : Gehirnschnitt; Ansicht von rostral der Behandlungsgruppe mit 240 mg/kg KG. Sichtbar ist das ausschließliche Wachsen der Tumorzellen im Bereich des Stichkanals.**



#### **4.5 Beobachtete Nebenwirkungen**

Im Ganzen wurde das Medikament von den Versuchstieren gut vertragen. Wir stellten nach einer Therapiedauer von 14 Tagen lediglich in der Gruppe mit der höchsten Medikamentendosis einen leichten Haarausfall fest. Es fanden sich keine weiteren Nebenwirkungen.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung eines Boswelliasäure-extraktes an einem Rattengliommodell untersucht. Vier randomisierten Rattengruppen wurden C6 Tumorzellen stereotaktisch in den rechten nucleus caudatus implantiert. Nach einer 14-tägigen Wachstumsphase erhielten drei Behandlungsgruppen unterschiedliche Dosen an Boswelliasäure- Extrakt und wurden mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Durch diese Untersuchung konnten wir folgende Erkenntnisse gewinnen:

1. Die Gruppe mit der höchsten Behandlungsdosis (3x240mg/kg KG) zeigte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit ( $P < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Verlängerung der Überlebenszeit bei den Behandlungsgruppen mit 3x60mg/kg KG und 3x120mg/kg KG war mit 4% und 23% ( $P > 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant.
2. Die Evaluation der Vitalität anhand einer Verhaltensklassifikationsskala zeigte eine Woche vor und nach Behandlungsbeginn mit Boswelliasäuren bei allen Tieren einen kontinuierlichen Abfall von 16 auf im Mittel  $11,38 \pm 0,47$  Punkte. Anschließend kam es bei der Behandlungsgruppe mit der höchsten Medikamentendosis zu einer kontinuierlichen Verbesserung der Vitalität, vergleichbar mit gesunden Tieren (16 Punkte). Bei allen anderen Gruppen kam es zu einem langsamen Abfall der Vitalität.
3. Als ein weiterer Vergleichsparameter wurde das Körpergewicht der Tiere im Verlauf der Studie evaluiert. Auch hier wurde eine signifikante Steigerung ( $P < 0.05$ ) des Gewichtes um im Mittel 9%

des Ausgangsgewichtes bei der höchsten Behandlungsgruppe gemessen (von  $239,9 \pm 3,11\text{g}$  auf  $260,9 \pm 4,5\text{g}$ ). Alle anderen Gruppen zeigten einen kontinuierlichen Abfall des Körpergewichtes.

Diese signifikante und konzentrationsabhängige Verlängerung der Überlebenszeit und Verbesserung des klinischen Zustands der Tiere durch die Behandlung mit Boswelliasäure-Extrakt kann in der Therapie von malignen Gliomen von klinischem Nutzen sein.

### ***5.1 Probleme in der Behandlung der malignen Gliomen***

Die Prognose der malignen Gliome ist nach wie vor schlecht. Es gibt bisher keine zufriedenstellende Therapieform dieser Tumore. Bei den Glioblastomen mit der höchsten Malignität, in der Gruppe der astrozytären Gliome, kann mit einer medianen Überlebenszeit nach Diagnosestellung ohne Tumorthherapie von zwei bis vier Monaten gerechnet werden (Jellinger K 1987).

Die operative Tumorentfernung verdoppelt diese Zeit (Karim et al. 1991). Durch zusätzliche postoperative Bestrahlung werden mediane Überlebenszeiten von 8 bis 18 Monaten erreicht. Die adjuvante Chemotherapie kann einen weiteren Gewinn an Überlebenszeit von ein bis zwei Monaten bewirken (Shapiro et al. 1989). Etwa 35 bis 50 Prozent der Patienten mit Glioblastom überleben postoperativ ein Jahr und nur 10 bis 20 Prozent zwei Jahre (Sauer et al. 1987).

Diese Daten werfen natürlich die Frage auf warum bis heute Patienten mit malignen Gliomen, vor allem dem Glioblastom, selbst durch eine multimodale aggressive Therapie mit Einsatz von chirurgischen, radio- und chemotherapeutischen Verfahren nicht geheilt werden können (Gundersen et al. 1998).

Aufgrund des aggressiven Einwachsens in benachbarte, gesunde Hirnstrukturen ist eine totale chirurgische Entfernung des Glioblastoms nahezu unmöglich. Des Weiteren kann im Hirngewebe nicht mit ausreichendem Sicherheitsabstand reseziert werden (Chiconie und Silbergeld 1995). Folglich dient der neurochirurgische Eingriff trotz erheblicher Weiterentwicklung der operativen Techniken vor allem einer Tumormassenreduktion mit Verbesserung der tumorbedingten neurologischen Symptome sowie histologischer Diagnosesicherung, stellt aber keine kurative Therapieoption dar. Ob hier ein echter Durchbruch in naher Zukunft erreicht werden kann ist fraglich (Mohan et al. 1998).

Auch die postoperative Bestrahlung führt zu einer insgesamt nur mäßigen Verlängerung der Überlebenszeit der Glioblastompatienten. HUNCHAREK und MUSAT beschreiben eine Erhöhung der mittleren Überlebenszeit von 14 Wochen ohne Bestrahlung auf 35-48 Wochen mit Bestrahlung (Huncharek und Muscat 1998).

Eine Ursache für diesen nur mäßigen Erfolg liegt nach aktuellen Erkenntnissen in den Resistenzmechanismen u.a. dem Verlust der Tumorsuppressorfunktion p53 der Tumorzellen. Durch diesen besonders häufig in Glioblastomzellen vorkommenden Genfunktionsverlust wird die Zellzyklusarretierung im Vergleich zu Zellen mit intakter p53-Funktion deutlich vermindert. Studien von FULCI et al. 1998 und SHU et al. 1998 gaben Hinweise, dass die Röntgenstrahlen bei der Strahlentherapie über eine p53-vermittelte Zellzyklusarretierung wirken. Dies könnte zu einer verminderten Ansprechbarkeit der Zellen mit Verlust von p53-Funktion führen (Fulci et al. 1998, Shu et al. 1998).

Die chemotherapeutischen Behandlungsoptionen besitzen bis heute keinen großen Stellenwert in der Therapie von Glioblastomen. In einer Studie von GUNDERSEN et al. 1998 konnte bei Patienten mit anaplastischen Astrozytomen durch eine Chemotherapie (Dreifachkombination von Carmustin, Vincristin und Procarbazin) kombiniert mit neurochirurgisch-radiotherapeutischen Behandlungen-

verfahren eine signifikante Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit im Mittel von 25 auf 80 Monaten beobachtet werden. Das gleiche Therapieverfahren zeigte beim Glioblastompatienten keinen Erfolg.

Da sowohl operative Behandlungsmethoden als auch strahlentherapeutische Verfahren technisch hoch entwickelt sind, lassen sich auf diesen Gebieten wesentliche Verbesserungen der Therapieergebnisse maligner Gliome nicht mehr erzielen. Eine Verbesserung der Ergebnisse der Chemotherapie hängt von der Einführung neuer Substanzen ab, wobei derzeit ein durchschlagender Erfolg nicht in Sicht ist. Daher richtet sich das wissenschaftliche Augenmerk zunehmend auf die Entwicklung neuer Therapiemodalitäten (Boeker und Winking 1997).

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Studie die Wirkung der Boswelliasäuren, pentazyklischen Triterpenen, die aus dem Harz der indischen Baumart *Boswellia Serrata* gewonnen werden, untersucht.

Das Harz des *Boswellia* Baums, in der Landessprache „Sali guggal“ genannt, wird neben der Verwendung als Weihrauch aufgrund seiner anti-inflamatorischen Wirksamkeit schon seit Jahrhunderten in der traditionellen Ayurveda-Medizin als Therapeutikum entzündlich bedingter Krankheiten angewendet (Safayhi et al. 1992). Erst seit kurzem allerdings ist bekannt, dass die hauptsächliche anti-inflamatorische Wirkung in Salai guggal von Boswelliasäuren gebildet wird (Safayhe et al. 1992, Singh und Atal 1986).

Boswelliasäuren gehören chemisch zu der pentazyklischen Triterpenen und weisen als Grundgerüst eine stark lipophile Struktur auf. Durch diese chemische Eigenschaft sind sie in der Lage die Blut-Hirn-Schranke in ausreichendem Maße per Diffusion zu überqueren und besitzen damit neben den funktionellen (siehe Kap. 5.2 und 5.3) die notwendigen

strukturellen Voraussetzungen für einen späteren Einsatz in der Therapie der malignen Gliome.

Als eine Ursache für die besonderen Schwierigkeiten Hirntumoren effektiv chemotherapeutisch behandeln zu können wird häufig die Blut-Hirn-Schranke angeführt.

### **5.1.1 Blut-Hirn-Schranke als Barriere**

Die Blut-Hirn-Schranke dient als System zur Erhaltung der Homöostase im zentralen Nervensystem mit Erleichterung des Übertritts von notwendigen Metaboliten und Regulierung des Abtransportes von nicht notwendigen oder toxischen Substanzen (Fishman 1980). Diese Charakteristika der Blut-Hirn-Schranke bedingen ihre Permeabilität für unterschiedliche Substanzen.

Zusätzlich hängt die Blut-Hirn-Schrankenpassage von der Lipidlöslichkeit der Substanzen ab. Ein entscheidender Faktor hierfür ist die Diffusion. Sehr lipophile Substanzen werden nahezu vollständig aus dem Blut extrahiert. Der einzige limitierende Faktor für die Anreicherung dieser Substanzen im Hirngewebe ist die cerebrale Durchblutung.

Auch für die über den Blutweg anströmenden Chemotherapeutika stellt die Blut- Hirnschranke eine Barriere dar, deren Übergang falls keine speziellen Transportwege vorhanden, vor allem von der Lipophilie der Substanz abhängt (Brandes und Foirentino 1996, Jolliet-Riant und Tillement 1999).

Grade in diesen für viele Chemotherapeutika beschriebenen Schwierigkeiten können jedoch die Vorteile der Boswelliasäuren liegen. Sie weisen eine stark lipophile pentazyklische Triterpenstruktur auf, welche die Diffusion durch die Blut- Hirnschranke in ausreichendem Maß

ohne auf spezielle Transport-mechanismen angewiesen zu sein ermöglicht.

Neben diesen strukturellen Eigenschaften weisen die Boswelliasäuren auch funktionelle Voraussetzungen auf um in der Chemotherapie der malignen Gliome erfolgreich angewendet werden zu können. Diese soll in den folgenden Abschnitten erläutert und anhand unserer Ergebnisse diskutiert werden.

### ***5.2 Wirkung der Boswelliasäuren auf die Leukotriensynthese***

Von Boswelliasäuren ist bekannt, dass sie die 5- Lipoxygenase als Schlüsselenzym der Leukotriensynthese hemmen können. Leukotriene sind als hochaktive Mediatoren an einer Vielzahl pathophysiologischer Prozesse in den peripheren Organen und im zentralen Nervensystem beteiligt. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass Boswelliasäuren in der Lage sind, die Leukotriensynthese in einer konzentrationsabhängigen Form zu hemmen. Hierzu wurden polymorphkernige Leukozyten eingesetzt, die Leukotriene aus endogener Arachidonsäure bilden. Gibt man Boswelliasäuren zu polymorphkernigen Leukozyten erreicht man Hemmungen der 5- Lipoxygenase mit einer  $IC_{50}$  zwischen 1,5 und 7  $\mu M$ . Im Vergleich zu zwei etablierten 5- Lipoxygenase-Inhibitoren (NDGA und Ebselen) sind Boswelliasäuren schwächer als NDGA, aber wirksamer als Ebselen (Safayhi et al. 1992). Im Gegensatz zu NDGA findet eine Hemmung der Cyclooxygenase oder 12- Lipoxygenase nicht statt. Da auch die Phospholipase A2 durch die Boswelliasäuren nicht beeinflusst wird, ist von einer selektiven Hemmung der 5-Lipoxygenase auszugehen (Safayhi et al. 1992).

Es ist bekannt, dass die hochmalignen Astrozytome, insbesondere das Glioblastoma multiforme, eine erhebliche Kapazität zur Synthese von Cysteinyl- Leukotrienen besitzen (Simmet et al. 1990; Winking 1997).

Inzwischen gibt es überzeugende Hinweise dafür, dass diese vom Tumor selbst gebildeten Leukotriene in pathophysiologischer Weise an der Entstehung des peritumoralen Hirnödems beteiligt sind (Simmet et al. 1990; Gaetani et al. 1991). Die für Glioblastompatienten typische und häufig schwere Hirndrucksymptomatik, sowie Hirnstammherniation mit Schädigung lebenswichtiger Hirnstrukturen und deren Folgen sind auf peritumorale Ödeme zurückzuführen (Ohnishi et al. 1990). Daher ist der Stellenwert einer effizienten konservativen Behandlung der ödembedingten Hirndruckerhöhung bei Gliompatienten hinsichtlich Lebensqualitätverbesserung und Lebenszeitverlängerung von großer Bedeutung (Hill et al. 1995). Die bisher zur Ödemvermeidung eingesetzten Glucocorticoide zeigen ein großes Spektrum an Nebenwirkungen, dass teilweise sogar die Wirkung der eingesetzten Chemotherapeutika herabsetzen kann (Wolff et al 1996).

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Studie die Wirkung eines Boswelliasäure-Extraktes an einem Rattengliommodell untersucht. Neben einer Verlängerung der Überlebenszeit konnte im Verlauf eine deutliche Besserung der klinischen Symptomatik in der höchsten Medikamentengruppe beobachtet werden. Während zu Therapiebeginn alle Tiere einen herabgesetzten Vitalitätsindex von im Mittel  $11,38 \pm 0,47$  Punkten zeigten, kam es im Verlauf der Behandlung mit Boswelliasäuren (240mg/kg) zu einem signifikanten Anstieg des Vitalitätsindex auf  $16 \pm 0$  Punkten. Dies entspricht einem normalen Tierverhalten.

Es ist anzunehmen, dass die hier beobachtete Verbesserung der Vitalität auf die hemmende Wirkung der Boswelliasäuren auf die Leukotriensynthese und Verminderung des peritumoralen Hirnödems zurückzuführen ist.

Ergebnisse in diesem Sinne lieferten auch Untersuchungen vom BOEKER und WINKING 1997. Sie konnten unter Verwendung eines äthanolischen Extraktes aus Boswelliasäure eine Reduktion des perifokalen Ödemvolumens bei malignen Glioblastompatienten



feststellen. In einer prospektiven, kontrollierten Studie an 29 Patienten, die unter einem malignen Glioblastom litten, erhielten 14 Patienten dreimal täglich 1200mg, 9 Patienten dreimal täglich 800mg und 5 Patienten dreimal täglich 400mg eines Boswelliaextraktes sieben Tage vor dem operativen Eingriff. Nur die Behandlung mit dreimal täglich 1200mg des Extraktes führte zu einer signifikanten Reduktion des perifokalen Ödemvolumens (Boeker und Winking 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte nur in der Behandlungsgruppe mit der höchsten Medikamentendosis (240mg/kg) ein signifikanter Anstieg des Vitalitätsindex auf 16 Punkte beobachtet werden. Alle anderen Behandlungsgruppen zeigten einen langsamen Abfall der Vitalität. In der mittleren Behandlungsgruppe war ein langsamerer Abfall des Vitalitätsindex im Vergleich zur 60mg Gruppe oder der Kontrollgruppe zu beobachten. Ebenfalls zeigten diese Tiere im Verlauf eine kontinuierliche Gewichtsreduktion im Vergleich zur Behandlungsgruppe mit 240mg/kg KG, welches unter anderem auf das schlechte Fressverhalten bei sinkendem Vitalitätsindex zurückzuführen ist.

Neben einer Verminderung des peritumoralen Hirnödems durch die Boswelliasäuren konnten BOEKER und WINKING in ihrer Studie auch klinische Veränderungen, wie Verbesserung der Hemiparese, Kopfschmerzen und motorischen Aphasie bei ihren Patienten beobachten (Boeker und Winking 1997).

So berichten die Autoren z.B. von Beschwerdefreiheit bei Tumorpatienten mit Hemiparesen und starken analgetikabedürftigen Kopfschmerzen nach Behandlung mit Boswelliasäuren sowie Patienten mit einer deutlichen motorischen Aphasie, die unter Therapie mit Boswelliasäure wieder frei sprechen konnten. Diese Beispiele korrelieren mit der in der vorliegenden Studie beobachteten Verbesserung der neurologischen Symptome wie z.B. Verbesserung der motorischen Defizite, Bewegungsschnelligkeit und Fluchtreaktion durch die Behandlung mit Boswelliasäuren.

Neben der o.g. Verbesserung der Vitalität konnte eine signifikante Überlebenszeitverlängerung der tumorimplantierten Ratten durch die Behandlung mit Boswelliasäure festgestellt werden. Dies ist möglicherweise auf den zytotoxischen Effekt der Boswelliasäuren auf Gliomzellen, durch eine Hemmung der nukleären Topoisomerasen, zurückzuführen (Wang et al. 1991, Heldt 1996).

### ***5.3 Wirkung der Boswelliasäuren auf Topoisomerasen***

Bereits im Altertum und im Mittelalter wurde immer wieder über die Anwendung von Weihrauch-Präparaten zur Behandlung von Tumoren und Geschwülsten berichtet (Martinez et al. 1988). Auch In-vitro-Untersuchungen in neuerer Zeit zeigen eine Antitumorwirkung von Boswelliasäuren aus dem Harz des indischen Weihrauchs an verschiedenen Tumorzelllinien (Wang et al. 1991, Jing et al. 1992).

WANG et al. konnten 1991 eine Antitumorwirkung des Extraktes aus Weihrauch durch Hemmung der Topoisomerase II von Leukämiezellen der Maus vorweisen (Wang et al. 1991).

JING et al. berichteten 1992 über Apoptose in verschiedenen Leukämiezellen unter Verwendung von Acetyl-Boswelliasäure. Ähnliche Ergebnisse wurden von Glaser et al. bei Anwendung von Acetyl-11-Keto- $\beta$ -Boswelliasäure, Acetyl- $\beta$ -Boswelliasäure und  $\beta$ -Boswelliasäure bei den Glioblastomzelllinien (T98G, LN-229, LN-18 und LN-308) beobachtet.

Auch die Zellkulturversuche von HELDT 1996 zeigten einen ausgeprägten zytotoxischen Effekt der Boswelliasäuren auf Glioblastomzellen des U-87 MG- und U-373 MG- Typs durch eine Hemmung der nukleären Topoisomerasen. Da hier eine signifikante Hemmung beider Topoisomerasen vorliegt, werden die Boswelliasäuren zu den Vertretern der seltenen dualen Topoisomeraseinhibitoren gezählt. Dadurch können die Tumorzellen im Vergleich zu selektiven

Topoisomerase I und II- Hemmern schwieriger wirksame Resistenzmechanismen ausbilden (Heldt 1996).

Die meisten klinisch eingesetzten Topoisomeraseinhibitoren führen durch ihren Wirkungsmechanismus zu typischen DNA-Strangbrüchen und besitzen ein erhebliches mutagens Potential. Diese so genannten Topoisomerasegifte greifen die Topoisomerasen erst, nachdem diese die DNA-Stränge gespalten haben, an und verhindern ein Wiederausammenfügen der Stränge.

In den letzten Jahren fand man andere Topoisomerasehemmstoffe die keine DNA-Strangbrüche aufwiesen, da sie die Topoisomerasen bereits vor ihrem ersten katalytischen Schritt (DNA-Strangtrennung) inhibieren. Sie wurden als catalytic inhibitors bezeichnet (Caparico et al. 1997).

Auch die Boswelliasäuren gehören zu der Gruppe der katalytischen Inhibitoren und weisen ein frühes Eingreifen in den Reaktionszyklus der Topoisomerasen mit Verhinderung von Strangbrüchen auf und besitzen ein mildes Nebenwirkungsspektrum. Auch ist ihr mutagenes Potential im Vergleich zu Topoisomerasegifte gering (Benchokraun et al. 1995).

Vor dem Hintergrund der o.g. Studien konnten in der vorliegenden Arbeit eine konzentrationsabhängige Wirksamkeit der Boswelliasäuren auf C6 Rattengliomzellen anhand von Überlebenszeitverlängerung und klinischem Zustand beobachtet werden. Es konnte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit der Ratten, behandelt mit der höchsten Medikamentendosis von 3x täglich 240mg/kg KG Boswelliasäure-Extrakt, beobachtet werden.

Im Verlauf lebten diese Tiere mit über 90 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 48 Tagen fast doppelt so lange. In den anderen Medikamentengruppen konnten liess sich eine geringe Verlängerung der Überlebenszeit feststellen.

Einerseits ist bekannt, dass die Boswelliasäuren durch ihre stark lipophile pentazyklische Triterpenstruktur die Blut- Hirnschranke über Diffusion passieren können. Vergleicht man andererseits die Ergebnisse der o.g. Zellkulturstudien mit den hier vorliegenden Ergebnissen, könnte unter anderem die hemmende Eigenschaft der Boswelliasäuren auf Topoisomerasen als ein Grund für die Verlängerung der Überlebenszeit in der Gruppe mit der höchsten Medikamentendosis angesehen werden.

Im Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten die Untersuchungen in der zweiten Arm dieser Studie bei einem ähnlichen Versuchsaufbau eine Tumorzellenreduktion und Apoptose der C6-Tumorzellen durch Boswelliasäuren. Hier konnte eine signifikante Verkleinerung der Tumormasse und höherer Apoptose im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits ab einer Medikamentendosis von 120mg/kg KG festgestellt werden (Winking et al. 2000).

#### ***5.4 Klinische Relevanz und Aussichten***

Auch heute noch ist die Prognose maligner Gliome ausgesprochen schlecht. Die „klassischen Therapieverfahren“ Operation und Bestrahlung versprechen keine entscheidende Verbesserung. Um so mehr gilt das Interesse der Verbesserung chemotherapeutischer Möglichkeiten und adjuvanter Therapien (Boeker und Winking 1997).

Vor diesem Hintergrund werden in der vorliegenden Studie die Wirkung eines Boswelliasäure-Extraktes an einem Rattengliommodell untersucht.

Bereits in früheren Untersuchungen wurden die zytotoxischen Effekte der Boswelliasäuren auf Glioblastomzellen, bedingt durch die Blockade beider Topoisomerasen (I und II) beschrieben (Heldt 1997). Darüber hinaus gelten die Boswelliasäuren als ein hochwirksamer 5-Lipoxygenaseinhibitor und führen über die Hemmung der Leukotriensynthese zu einer Verminderung des peritumoralen Hirnödems

(Safayhi et al 1992) und einer Besserung der klinischen Symptomatik bei Glioblastompatienten (Boeker und Winking 1997).

Der gedankliche Ansatz der vorliegenden Arbeit war daher, unterstützend zu bereits vorhandenen zellkulturellen Ergebnissen über die Wirkung der Boswelliasäuren, in einem experimentellen Tierversuch quantitative Daten über die Wirkung der Boswelliasäuren auf maligne Gliome in vivo zu gewinnen.

Vier randomisierten Rattengruppen wurden C6 Tumorzellen stereotaktisch in den rechten nucleus caudatus implantiert. Nach einer 14-tägigen Wachstumsphase erhielten drei Behandlungsgruppen unterschiedliche Dosen an Boswelliasäure-Extrakt und wurden mit einer Kontrollgruppe verglichen. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit sowie Verbesserung der Vitalität und des Gewichtes der tumorimplantierten Ratten in der höchsten Medikamentengruppe im Vergleich zu Kontrollgruppe (siehe Ergebnisse).

Diese signifikante, konzentrationsabhängige Verlängerung der Überlebenszeit und Verbesserung des klinischen Zustandes der Tiere durch die Behandlung mit Boswelliasäure-Extrakt kann in der Therapie von malignen Gliomen von klinischem Nutzen sein.

Vor dem Einsatz der hier getesteten Substanz sollten jedoch einige Fragen geklärt werden. Ein schwerwiegendes Problem in der Therapie mit Extrakt aus Boswelliasäuren liegt im phytopharmakologischen Ursprung der Substanz. Das in dieser Studie verwendete Extrakt besteht aus einem Gemisch verschiedener Subtypen der Boswelliasäuren. Die Konzentration der pharmakologisch wirksamen Bestandteile im verabreichten Gemisch ist abhängig vom Reinheitsgrad, der bei der Extraktion aus dem Weihrauchharz erzielt wird. Es sind deshalb durchaus Schwankungen in der Qualität verschiedener Chargen denkbar.

Einige dieser Schwierigkeiten könnten durch die Extraktion und Reinigung der wichtigsten Subtypen der Boswelliasäuren gelöst werden. Mit diesen gereinigten Substanzen wäre die Identifizierung der meisten Boswelliasäuren und eine standardisierte klinische Behandlung möglich.

Bevor Aussagen über die Rolle von Boswelliasäuren in der Therapie von Glioblastomen gemacht werden können, muss darüber hinaus eine klinische Pilotstudie Ergebnisse in diesem Sinne liefern, um Voraussetzungen für eine umfassende kontrollierte klinische Prüfung des Präparates zu schaffen. Weiterhin sind genaue Untersuchungen zu Pharmakokinetik den Boswelliasäure-Präparaten notwendig.

Über die Beeinflussung der Überlebenszeit in der Behandlung malignen Gliomen durch Boswelliasäuren gibt es bis heute keine in der Literatur beschriebenen Untersuchungen. Durch diese Studie konnte eine signifikante konzentrationsabhängige Überlebenszeitverlängerung durch die Behandlung mit einem Boswelliasäure-Extrakt in einem Rattengliommodell erstmalig in vivo nachgewiesen werden.

## 6. Zusammenfassung

Gliome machen etwa 45-55% der intrakraniellen Tumoren des Kindes- und Erwachsenenalters aus. Trotz erheblicher Weiterentwicklung der diagnostischen Verfahren, der operativen Techniken und Radiotherapie ist die Behandlung von malignen Gliomen bis heute noch unbefriedigend. Insbesondere hat die adjuvante Chemotherapie bisher versagt und konnte somit die Überlebenszeit von Gliompatienten nicht signifikant beeinflussen. Hier ist jedoch am ehesten eine Verbesserung der Behandlung der bösartigen Hirntumoren durch die Einführung neuer Substanzen zu erwarten.

Frühere Studien haben bereits eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung der Zellkulturen von Gliomzell- Linien durch den Einsatz des Phytotherapeutikums Boswelliasäure gezeigt. Darüber hinaus wurden in klinischen Studien eine Verbesserung des perifokalen Ödems sowie der klinischen Symptome der Patienten durch den Einsatz der Boswelliasäuren beobachtet.

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, den Einfluss der Boswelliasäuren auf die Überlebenszeit und die klinischen Symptome anhand eines Rattengliom- Modells in vivo zu untersuchen.

Weiblichen Wistar Ratten mit einem Gewicht von 200-250g wurden C6-Gliomzellen in den rechten Nucleus Caudatus implantiert und in vier randomisierte Gruppen aufgeteilt. Die Therapiegruppen wurden mit unterschiedlichen Medikamentendosen behandelt und mit der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Die Überlebenszeit der Ratten in der Gruppe mit der höchsten Medikamentendosis (3X240 mg/kg KG) lag mehr als doppelt so hoch wie die der Kontrollgruppe ( $P < 0.05$ ).

Darüber hinaus fand sich eine deutliche Verbesserung der Vitalität und des Gewichtes der Tiere, behandelt mit der höchsten Medikamentendosis (3X240 mg/kg KG) im Vergleich zu der unbehandelten Gliom-Gruppe.

Diese Daten demonstrieren die positive Wirkung der Boswelliasäuren auf die Rattengliome und repräsentieren eine neue Option in der Therapie humaner Gliome in der Zukunft. Um eine definitive Aussage zu machen sind jedoch noch weitere experimentelle Studien an humanen Gliomen notwendig.



## SUMMARY

Gliomas constitute the largest group of intracranial neoplasms accounting for 45-55% of the brain tumors in both children and adults. Despite remarkable progress in diagnostic imaging, microsurgical tumor removal techniques and radiation therapy, there are no satisfying results in malignant glioma therapy till now. Especially the adjuvant chemotherapy failed to date to influence survival time in glioma patient's significantly. Establishing additional substance might lead to an improvement results in malignant glioma therapy especially in this field.

Previous studies have shown a proliferation inhibiting activity of boswellic acids, an extract from gum resin in Glioma-cell cultures. In patients a significant reduction on perifocal edema by boswellic acids accompanied with a clinical improvement with malignant glioma was observed.

The aim of the present study was to elucidate a possible influence of the boswellic acids, which are constituents of an extract from gum resin on survival time and clinical state in vivo.

Female wistar rats weighting 200-250 g were treated with the drug 14 days after inoculation of C6 tumor cells into their right caudate nucleus and randomization into 4 groups. The treatment groups received different dosages and were compared to a control group without any additional treatment. Survival time of the rats in the highest dosage group (3X240 mg/kg body weight) was more than twice as long as in the control group ( $P < 0.05$ ). Furthermore we observed a significant improvement of animal's vitality and weight, receiving the highest dosage of Boswellic acid (3X240 mg/kg body weight) in comparison with the control group.

These data demonstrate an influence of Boswellic acid in rat glioma and might represent a new therapeutic option on glioma treatment in man in future. Further experimental work on human gliomas is needed to definitively answer this question.

**A. ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<b>ABBILDUNG 1:</b> HARZ DES INDISCHEN WEIHRAUCHSBAUM .....	22
<b>ABBILDUNG 2:</b> STRUKTURMODELL DER BOSWELLIA-SÄUREN.....	24
<b>ABBILDUNG 3:</b> CYCLOOXYGENASE- UND LIPOXYGENASE-WEG DES ARACHIDONSÄURE-METABOLISMUS .....	33
<b>ABBILDUNG 4:</b> HAMILTON- SPRITZE.....	49
<b>ABBILDUNG 5:</b> DAS STEREOTAKTISCHE KLEINTIERINSTRUMENT .....	50
<b>ABBILDUNG 6:</b> BEHANDLUNGSBEGINN 14 TAGE NACH DER TUMOR- IMPLANTATION MIT VERSCHIEDENEN DOSIERUNGEN. N=10 FÜR JEDE GRUPPE.....	61
<b>ABBILDUNG 7:</b> VERÄNDERUNG DES KÖRPERGEWICHTES IM VERLAUF DER STUDIE. N=10 FÜR JEDE GRUPPE. BEHANDLUNGSBEGINN 14 TAGE NACH DER IMPLANTATION MIT VERSCHIEDENER MEDIKAMENTENDOSIS.....	65
<b>ABBILDUNG 8:</b> VERGLEICH DER ÜBERLEBENSZEIT DER VERSUCHS- GRUPPEN. BEHANDLUNGSBEGINN 14-TAGE NACH DER TUMORIMPLANTATION. KAPLAN-MEIER-SCHÄTZUNG FÜR KUMULTATIVE ÜBERLEBENSZEIT ZEIGT EINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED ZWISCHEN KONTROLLGRUPPE UND BE- HANDLUNGSGRUPPE MIT DER HÖCHSTEN MEDIKAMENTEN-DOSIS. .....	67
<b>ABBILDUNG 9:</b> GEHIRNSCHNIT; MAKROSKOPISCHE ANSICHT VON ROSTRAL. IN DER UNBEHANDELTEN TIERGRUPPE ZEIGT DER TUMOR IN DER RECHTEN HEMISPHERE EIN DEUTLICHES WACHSTUM.....	70
<b>ABBILDUNG 10:</b> GEHIRNSCHNITT; ANSICHT VON ROSTRAL DER BE- HANDLUNGSGRUPPE MIT 240 MG/KG KG. SICHTBAR IST DAS AUSSCHLIEßLICHE WACHSEN DER TUMORZELLEN IM BEREICH DES STICHKANALS. ....	70

**B. TABELLENVERZEICHNIS**

<b>TAB.1:</b> KLASSIFIKATIONSSCHEMATA KERNOHAN ET AL. 1949 .....	5
<b>TAB.2:</b> WHO-KLASSIFIKATION DER TUMOREN DES NERVENSYSTEMS .....	6
<b>TAB. 3:</b> HAUPTINHALTSSTOFFE DES WEIHRAUCHS .....	23
<b>TAB.4:</b> HISTORISCHE UND MODERNE MEDIZINISCHE VERWENDUNG VON TEILEN DES WEIHRAUCHBAUMES .....	30
<b>TAB.5:</b> PARAMETER ZUR BERECHNUNG DES VITATLITÄTSINDEX .	55

**C. LITERATURVERZEICHNIS**

1. Adelakun EA, Finbar EA, Agina SE, Makinde AA. Antimicrobial activity of *Boswellia dalzielii* stem bark. *Fitoterapia* 2001; 72: 822-824
2. al-Said MS, Tariq M, al-Yahya MA. Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 1990; 28: 305-312
3. Ammirati M, Galicich JH, Arbit E, Liao Y. Reoperation in the treatment of recurrent intracranial malignant gliomas. *Neurosurgery* 1987; 21: 607-614
4. Ammon HPT, Mack T, Singh GB, Safayhi H. Inhibition of leukotriene B4 formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata*. *Planta Medica* 1991; 57: 203-207
5. Ammon HPT. Ein neuer Weg in der Therapie von Entzündungen. *Deutsche Apotheker Zeitung* 1992; 45: 2442-2444
6. Ammon HPT, Safayhi H, Mack T, Sabieraj J. Mechanism of antiinflammatory actions of curcumine and boswellic acids. *Journal of Ethnopharmacology* 1993; 38: 113-119
7. Baba T, Chio CC, Black KL. The effect of 5-lipoxygenase inhibition on blood-brain barrier permeability in experimental brain tumors. *Journal of Neurosurgery* 1992; 77: 403-406
8. Baguley BC, Ferguson LR. Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1400: 213-222
9. Bailey P, Cushing H. A classification of the tumors of the gliomas on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Lippincott, Philadelphia 1962
10. Benchokroun Y, Couprie J, Larsen AK. Aurintricarboxylic acid, a putative inhibitor of apoptosis, is a potent inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in Chinese hamster fibrosarcoma cells. *Biochemical Pharmacology* 1995; 49: 305-313
11. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 1968; 161: 370-371
12. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64: 235-248
13. Boden SE, Schweizer S, Bertsche T. Stimulation of leukotriene synthesis in intact polymorphonuclear cells by the 5-lipoxygenase inhibitor 3-oxo-tirucallic acid. *Molecular Pharmacology* 2001; 60: 267-273
14. Böker DK. Lymphocytic infiltration in human intracranial tumors-morphologic evidence for a host immune reaction and comparison with the leukocyte migration inhibition (LMI) test. *Clinical Neuropathology* 1982; 1: 113-120

15. Böker DK, Kalff R, Gullotta F, Weekes-Seifert S, Mohrer U. Mononuclear infiltrates in human intracranial tumors as a prognostic factor. Influence of preoperative steroid treatment. I. Glioblastoma. *Clinical Neuropathology* 1984; 3: 143-147
16. Böker DK, Winking M. Die Rolle von Boswelliasäuren in der Therapie maligner Gliome. *Deutsches Ärzteblatt* 1997; 94: A1197-1199
17. Borgeat P, Samuelsson B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1979; 76: 3213-3217
18. Borgeat P, Samuelsson B. Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Formation of a novel dihydroxyeicosatetraenoic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 1979; 254: 2643-2646
19. Bouffet E, Bernard JL, Frappaz D, Gentet JC, Roche H, Tron P, Carrie C, Raybaud C, Joannard A, Lapras C. M4 protocol for cerebellar medulloblastoma: supratentorial radiotherapy may not be avoided. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1992; 24: 79-85
20. Brandes AA, Fiorentino MV. The role of chemotherapy in recurrent malignant gliomas: an overview. *Cancer Investigation* 1996; 14: 551-559
22. Bray M. Pharmacology and pathophysiology of leukotriene B<sub>4</sub>. *British Medical Bulletin* 1983; 39: 249-254
23. Brigham KL, Ogletree ML. Effects of prostaglandins and related compounds on lung vascular permeability. *Bulletin European de Physiopathologie Respiratoire* 1981; 17: 703-722
24. Brill SJ, DiNardo S, Voelkel-Meiman K, Sternglanz R. Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. *Nature* 1987; 326: 414-416
25. Brocklehurst WE. The release of histamine and formation of a slow reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock. *The Journal of Physiology* 1960; 151: 416-435
26. Brooks WH, Markesbery WR, Gupta GD, Roszman TL. Relationship of lymphocyte invasion and survival of brain tumor patients. *Annals of Neurology* 1978; 4: 219-224
27. Buonassisi GS, Cordon S, Cohen A. Hormone producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1962; 48: 1184
28. Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 1985; 56: 1106-1111
29. Busija D, Leffler C, Beasley D. Effects of leukotrienes C, D, and E on cerebral arteries of newborn pigs. *Pediatric Research* 1986; 20: 973-976

30. Busija DW, Leffler CW. Leukotrienes increase levels of prostanoids in cerebrospinal fluid in piglets. *Prostaglandins* 1986; 32: 803-811
31. Cajal S. Sobre un nuovo proceder de impregnacion de la neuroglia. *Trab Labortory Investigations Biology* 1913; 11: 219-237
32. Capranico G, Binaschi M, Borgnetto ME, Zunino F, Palumbo M. A protein mediated mechanism for the DNA sequence specific action of topoisomerase II poisons. *Trends in Pharmacological Sciences* 1997; 18: 323-329
33. Castelli MG, Butti G, Chiabrando C, Cozzi E, Fanelli R, Gaetani P, Silvani V, Paoletti P. Arachidonic acid metabolic profiles in human meningiomas and gliomas. *Journal of Neurooncology* 1987; 5: 369-375
34. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazer O, Perez-Tamayo R, Kramer S, Weinstein A, Nelson JS, Tsukada Y. Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study. *Cancer* 1983; 52: 997-1007
35. Chaudhuri SK, Huang L, Fullas F, Brown DM, Wani MC, Wall ME. Isolation and structure identification of an active DNA strand-scission agent, (+)-3,4-di-hydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan. *Journal of Natural Products* 1995; 58: 1966-1969
36. Chicoine MR, Silbergeld DL. The in vitro motility of human gliomas increases with increasing grade of malignancy. *Cancer* 1995; 75: 2904-2909
37. Claesson HE, Dahlberg N, Gahrton G. Stimulation of human myelopoiesis by leukotriene B<sub>4</sub>. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1985; 131: 579-585
38. Conway LW. Stereotaxic diagnosis and treatment of intracranial tumors including an initial experience with cryosurgery for pinealomas. *Journal of Neurosurgery* 1973; 38: 453-460
39. Cooper C, Jones HG, Weller RO, Walker V. Production of prostaglandins and thromboxane by isolated cells from intracranial tumours. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1984; 47: 579-584
40. Corey EJ, Clark D, Goto G. Stereospecific total synthesis of a slow reacting substance of anaphylaxis, leukotriene. *Journal of the American Chemical Society* 1980; 102: 1436-1439
41. Corey EJ, Niwa H, Falck JR, Mioskowski C, Arai Y, Marfat A. Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids. *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research* 1980 ;6: 19-25
42. Cox L. The cytology of the glioma group with special reference to the inclusion of cells derived from the invaded tissue. *The American Journal of Pathology* 1932; 9: 839-898

43. Cozzarelli NR. DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Science*, 1980; 207: 953-960
44. Cunningham FM, Wong E, Woollard PM, Greaves MW. The chemokinetic response of psoriatic and normal polymorphonuclear leukocytes to arachidonic acid lipooxygenase products. *Archives of Dermatological Research* 1986; 278: 270-273
45. Curnes JT, Laster DW, Ball MR, Moody DM, Witcofski RL. MRI of radiation injury to the brain. *American Journal of Roentgenology* 1986; 147: 119-124
46. Czop JK, Austen KF. Functional discrimination by human monocytes between their C3b receptors and their recognition units for particulate activators of the alternative complement pathway. *Journal of Immunology* 1980; 125: 124-128
47. Dahlen SE. Pulmonary effects of leukotrienes. *Acta Physiologica Scandinavica* 1983; 512: 1-51
48. Dahmen U, Gu YL, Dirsch O, Fan LM, Li J, Shen K, Broelsch CE. Boswellic acid, a potent antiinflammatory drug, inhibits rejection to the same extent as high dose steroids. *Transplantation Proceedings* 2001; 33: 539-541
49. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer* 1988; 62: 2152-2165
50. Davies E, Clarke C, Hopkins A. Malignant cerebral glioma-II: Perspectives of patients and relatives on the value of radiotherapy. *British Medical Journal* 1996; 313: 1512-1516
51. Davis CH, Joglekar VM. Cerebellar astrocytomas in children and young adults. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 1981; 44: 820-828
52. Davis DL, Hoel D, Fox J, Lopez A. International trends in cancer mortality in France, West Germany, Italy, Japan, England and Wales, and the USA. *Lancet* 1990; 336: 474-481
53. Dembinska-Kiec A, Simmet T, Peskar BA. Formation of leukotriene C4-like material by rat brain tissue. *European Journal of Pharmacology* 1984; 99: 57-62
54. Di Nardo S, Voelkel K, Sternglanz R. DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: Topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1984; 81: 2616-2620
55. Dirks P, Bernstein M, Muller PJ, Tucker WS. The value of reoperation for recurrent glioblastoma. *Canadian Journal of Surgery* 1993; 36: 271-275
56. Ennet D, Poetsch F, Gröditsch D. Indischer Weihrauch. *Deutsche Apotheker Zeitung* 2000; 140: 1887-1895



57. Ennet D, Poetsch F, Schopka D. Indischer Weihrauch. Pharmazeutische Bewertung der Harzdroge und ihrer Zubereitungen. Deutsche Apotheker Zeitung 2000; 140: 105-113
58. Etzel R. Special extract of boswellia serrata (H 15™) in the treatment of rheumatoid arthritis. Phytomedicine 1996; 3: 91-94
59. Feldberg W, Kellaway CH. Liberation of histamine and formation of lysocithin-like substances by cobra venom. The Journal of Physiology 1938; 94: 187-226
60. Ferguson LR, Baguley BC. Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. Mutation Research 1996; 355: 91-101
61. Ferguson LR. Inhibitors of topoisomerase II enzymes: a unique group of environmental mutagens and carcinogens. Mutation Research 1998; 400: 271-278
62. Feun LG, Savaraj N, Landy HJ. Drug resistance in brain tumors. Journal of Neuro-oncology 1994; 20: 165-176
63. Findlay JM, Macdonald RL, Weir BK. Current concepts of pathophysiology and management of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews 1991; 3: 336-361
64. Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP. Metaanalysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. Cancer 1993; 71: 2585-2597
65. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature 1980; 286: 264-265
66. Fulci G, Ishii N, Van Meir EG. p53 and brain tumors: from gene mutations to gene therapy. Brain Pathology 1998; 8: 599-613
67. Gaetani P, Rodriguez Y, Baena R, Marzatico F. "Ex vivo" release of eicosanoid from human brain tissue: its relevance in the development of brain edema. Neurosurgery 1991; 28: 853-857
68. Gellert M. DNA topoisomerases. Annual Review of Biochemistry 1981; 50: 879-910
69. Gerhardt H. Therapeutischer Nutzen des Boswellia-Serrata-Extrakts H 15. Die Medizinische Welt 2000: 37-39
70. Gerhardt H, Seifert F, Buvari P, Vogelsang H, Repges R. Therapy of active Crohn disease with Boswellia serrata extract H 15. Zeitschrift für Gastroenterologie 2001; 39: 11-17
71. Giese A, Westphal M. Glioma invasion in the central nervous system. Neurosurgery 1996; 39: 235-250

72. Giovanella BC, Stehlin JS, Wall ME, Wani MC, Nicholas AW, Liu LF, Silber R, Potmesil M. DNA topoisomerase I--targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts. *Science* 1989; 246: 1046-1048
73. Gjerris F. Clinical aspects and long-term prognosis of intracranial tumours in infancy and childhood. *Developmental Medicine and Child Neurology* 1976; 18: 145-159
74. Glaser T, Winter S, Groscurth P, Safayhi H, Sailer ER, Ammon HPT, Schabet M, Weller M. Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity. *British Journal of Cancer* 1999; 80: 756-765
75. Goldberg RN, Suguihara C, Streitfeld MM, Bancalari A, Clark MR, Bancalari E. Effects of a leukotriene antagonist on the early hemodynamic manifestations of group B streptococcal sepsis in piglets. *Pediatric Research* 1986; 20: 1004-1008
76. Gundersen S, Lote K, Watne K. A retrospective study of the value of chemotherapy as adjuvant therapy to surgery and radiotherapy in grade 3 and 4 gliomas. *European Journal of Cancer* 1998; 34: 1565-1569
77. Gupta I, Parihar A, Malhotra P, Singh GB, Lüdtke R, Safayhi H, Ammon HPT. Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis. *European Journal of Medical Research* 1997; 2: 37-43
78. Gupta I, Gupta V, Parihar A, Gupta S, Lüdtke R, Safayhi H, Ammon HPT. Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with bronchial asthma: results of a double-blind, placebo-controlled, 6-week clinical study. *European Journal of Medical Research* 1998; 3: 511-514
79. Gupta I, Parihar A, Malhotra P, Gupta S, Lüdtke R, Safayhi H, Ammon HPT. Effects of gum resin of *Boswellia serrata* in patients with chronic colitis. *Planta Medica* 2001; 67: 391-395
80. Hairfield E, Hairfield H, Pentz L. A Rapid Test for the Identification of Incense Resins. *Perfumer Flavorist* 1984; 9: 33-36
81. Halbey O. Über das Olibanum. Dissertation Universität Bern 1898
82. Ham RG. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Experimental cell research* 1963; 29: 515-526
83. Heck MM, Hittelman WN, Earnshaw WC. Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1988; 85: 1086-1090
84. Heldt RM, Winking M, Simmet T. Cysteinyl leukotrienes as potential mediators of the peritumoral brain oedema in astrocytoma patients. *Naunyn Schmiedeberg's Archive of Pharmacology* 1996; 353: Abstr. 538
85. Heldt RM, Syrovets T, Winking M. Boswellic acids exhibit cytotoxic effects on brain tumor cells independent from 5-lipoxygenase Inhibition. *Naunyn Schmiedeberg's Archive of Pharmacology* 1997; 355: Abstr. 30

86. Hill JS, Kahl SB, Stylli SS, Nakamura Y, Koo MS, Kaye AH. Selective tumor kill of cerebral glioma by photodynamic therapy using a boronated porphyrin photosensitizer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1995; 92: 12126-12130
87. Hoernlein RF, Orlikowsky T, Zehrer D, Niethammer D. Acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999; 28: 613-619
88. Horteiga P del Rio. Es tercer elemento de los centos nerviosos. Sección biológica: órgano del Instituto de Ciencias Naturales José de Acosta 1919; 9: 69-120
89. Hoshino T, Wilson CB. Cell kinetic analyses of human malignant brain tumors (gliomas). *Cancer* 1979; 44: 956-962
90. Hoshino T. Cellular aspects of human brain tumors (gliomas). *Advances in cellularneurobiology*. Academic Press New York 1981; 2: 567-569
91. Hostanska K, Daum G, Saller R. Cytostatic and apoptosis-inducing activity of boswellic acids toward malignant cell lines in vitro. *Anticancer Research* 2002; 22: 2853-2862
92. Hounsfield GN. Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system. *The British Journal of Radiology* 1973; 46: 1016-1022
93. Huncharek M, Muscat J. Treatment of recurrent high grade astrocytoma; results of a systematic review of 1,415 patients. *Anticancer Research* 1998; 18: 1303-1311
94. Hwang JL, Shyy SH, Chen AY, Juan CC, Whang-Peng J. Studies of topoisomerase-specific antitumor drugs in human lymphocytes using rabbit antisera against recombinant human topoisomerase II polypeptide. *Cancer Research* 1989; 49: 958-962
95. Imbesi A. Indice delle piante finora ammesse nelle farmacopee ufficiali dei diversi stati del mondo. *Scilla Messina* 1964; 6: 68-73
96. Irvine RF. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *The Biochemical Journal* 1982; 204: 3-16
97. Janssen G, Bode U, Breu H, Dohrn B, Engelbrecht V, Göbel U. Boswellic acids in the palliative therapy of children with progressive or relapsed brain tumors. *Klinische Pädiatrie* 2000; 212: 189-195
98. Jazwinski SM, Edelman GM. Evidence for participation of a multiprotein complex in yeast DNA replication in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 1984; 259: 6852-6857
99. Jellinger K. Therapy of Malignant Brain Tumors. In: Jellinger, K (Hrsg.). Springer Verlag Wien New York 1987; 3: 85-96

100. Jing Y, Xia L, Han R. Growth inhibition and differentiation of promyelocytic cells (HL-60) induced by BC-4, an active principle from *Boswellia carterii* Birdw. Chinese Medical Sciences Journal 1992; 7: 12-15
101. Jing Y, Xia L, Nakaya K, Fang Q, Waxman S, Han R. Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. Leukemia Research 1999; 23: 43-50
102. Jolliet-Riant P, Tillement J. Drug transfer across the blood-brain barrier and improvement of brain delivery. Fundamental & Clinical Pharmacology 1999; 13: 16-26
103. Kamitani T, Little MH, Ellis EF. Effect of leukotrienes, 12-HETE, histamine, bradykinin, and 5-hydroxytryptamine on in vivo rabbit cerebral arteriolar diameter. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 1985; 5: 554-559
104. Kapil A, Moza N. Anticomplementary activity of boswellic acids--an inhibitor of C3-convertase of the classical complement pathway. International Journal of Immunopharmacology 1992; 14: 1139-1143
105. Kar A, Menon MK. Analgesic effect of the gum resin of *Boswellia serrata* Roxb. Life Sciences 1969; 8: 1023-1028
106. Karim A, Laws E. Glioma, Principles and Practice in Neuro-Oncology. Springer Wien New York 1991; 2: 84-91
107. Kernohan J, Mabon R, Svien H, Adson A. Symposium on a new and simplified concept of gliomas. Proceedings of the staff meetings. Mayo Clinic 1949 ;24: 71-75
108. Kernohan J, Sayre G. Tumors of the central nervous system. Armed Forces Institute of Pathology, Washington 1952: 30-37
109. Kiwak KJ, Moskowitz MA, Levine L. Leukotriene production in gerbil brain after ischemic insult, subarachnoid hemorrhage, and concussive injury. Journal of Neurosurgery 1985; 62: 865-869
110. Kleihues P, Matsumoto S, Wechsler W, Zülch KJ. Morphology and growth of tumors of the nervous system produced transplacentally by ethylnitroso-urea. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 1968; 52: 372-380
111. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. Tumours of Neuroepithelial Tissue. In: Kleihues P, Burger, PC, Scheithauer BW (Hrsg.). Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System. Springer Wien New York 1993: 61-72
112. Kreth FW, Faist M, Warnke PC, Rossner R, Volk B, Ostertag CB. Interstitial radiosurgery of low-grade gliomas. Journal of Neurosurgery 1995; 82: 418-429
113. Krieglstein CF, Anthoni C, Rijcken EJ, Laukötter M, Spiegel HU, Boden SE, Schweizer S, Safayhi H. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid, a constituent of a herbal medicine from *Boswellia serrata* resin, attenuates experimental ileitis. International Journal of Colorectal Disease 2001; 16: 88-95

114. Lacroix M, Abi-Said D, Fournay DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of Neurosurgery* 2001; 95: 190-198
115. Liu LF, Liu CC, Alberts BM. Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell* 1980; 19: 697-707
116. Liu LF, Rowe TC, Yang L, Tewey KM, Chen GL. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *The Journal of Biological Chemistry* 1983; 258: 15365-15370
117. Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annual Review of Biochemistry* 1989 ;58: 351-375
118. Lowry OH, Rosebrough W, Farr AL, Randall R. Biological Chemie. *Journal of Biological Chemistry* 1951; 193: 265
119. Mahajan B, Taneja S, Sethi V, Dhar K. Two triterpenoids from *Boswellia serrata* gum resin. *Phytochemistry* 1995; 39: 453-455
120. Mahaley MS, Jr. Neuro-oncology index and review (adult primary brain tumors). Radiotherapy, chemotherapy, immunotherapy, photodynamic therapy. *Journal of Neuro-Oncology* 1991; 11: 85-147
121. Mahato SB, Nandy AK, Roy G. Triterpenoids. *Phytochemistry* 1992; 31: 2199-2149
122. Martinez D, Lohs K, Janzen J. Weihrauch und Myrrhe. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* 1988: 10-29
123. Mattern MR, Paone RF, Day RS, 3rd. Eukaryotic DNA repair is blocked at different steps by inhibitors of DNA topoisomerases and of DNA polymerases alpha and beta. *Biochimica et Biophysica Acta* 1982; 697: 6-13
124. Mayhan WG, Sahagun G, Spector R, Heistad DD. Effects of leukotriene C4 on the cerebral microvasculature. *The American Journal of Physiology* 1986; 251: 471-474
125. Menon MK, Kar A. Analgesic and psychopharmacological effects of the gum resin of *Boswellia serrata*. *Planta Medica* 1971; 19: 333-341
126. Mohan DS, Suh JH, Phan JL, Kupelia PA, Cohen BH, Barnett G. Outcome in elderly patients undergoing definitive surgery and radiation therapy for supratentorial glioblastoma multiforme at a tertiary care institution. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 1998; 42: 981-987
127. Moskowitz MA, Kiwak KJ, Hekimian K, Levine L. Synthesis of compounds with properties of leukotrienes C4 and D4 in gerbil brains after ischemia and reperfusion. *Science* 1984; 224: 886-889

128. Ngashima G, Suzuki R, Hokaku H, Takahashi M. Graphic analysis of microscopic tumor cell infiltration, proliferative potential, and vascular endothelial growth factor expression in an autopsy brain with glioblastoma. *Surgical Neurology* 1999 ;51: 292-299
129. Ohnishi T, Hayakawa T, Shapiro WR. Human malignant gliomas secrete a factor that increases brain capillary permeability: role in peritumoural brain oedema. *Acta Neurochirurgica* 1990; 51: 137-139
130. Onishi Y, Azuma Y, Sato Y, Mizuno Y, Tadakuma T, Kizaki H. Topoisomerase inhibitors induce apoptosis in thymocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993; 1175: 147-154
131. Osherhoff N. Eukaryotic Topoisomerase II - Characterization of enzyme turnover. *The Journal of Biological Chemistry* 1986; 261: 9944-9950
132. Pardhy M, Bhattacharyya S.  $\beta$ -Boswellic acid, acetyl- $\beta$ -boswellic acid, acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid and 11-keto- $\beta$ -boswellic acid, four pentacyclic triterpene acids from the resin of *Boswellia serrata* Roxb. *Indian Journal of Chemistry B* 1978; 16B: 176-178
133. Posner J. Brain tumors. *Cancer Journal for Clinicians* 1993; 43: 261-271
134. Raffaelli M, Mosit S, Tardelli M. The frankincense tree (*Boswellia sacra* Flueck, Burseraceae) in Dhofar, southern Oman: field-investigations on the natural populations. *Webbia* 2003; 58: 133-149
135. Rajnikant GV, Rangari V, Bapat S, Agarwal R, Gupta R. Crystallographic analysis of acetyl-boswellic acid. *Crystal Research and Technology* 2001; 36: 93-100
136. Rampling R. Modern aspects of radiation therapy for glial tumours of the brain. *Forum* 1998; 8: 289-301
137. Recio MC, Giner RM, Manez S, Rios JL. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Medica* 1995; 61: 182-185
138. Reddy GK, Dhar SC, Singh GB. Urinary excretion of connective tissue metabolites under the influence of a new non-steroidal anti-inflammatory agent in adjuvant induced arthritis. *Agents and Actions* 1987; 22: 99-105
139. Reulen HJ. Vasogenic brain oedema. New aspects in its formation, resolution and therapy. *British Journal of Anaesthesia* 1976; 48: 741-752
140. Robichaud LJ, Marcoux FW. Cold injury, blood-brain barrier changes, and leukotriene synthesis: inhibition by phenidone. *Journal of Neurotrauma* 1990; 7: 193-206
141. Rose F, Fields W. Neoplasmen. *Neuro-Oncology* 1985: 23-29
142. Russell D, Rubinstein L. Pathology of tumours of the nervous system. *Journal of the Arnold Arboretum* 1990; 3: 67-71

143. Ruzicka L, Wirz W. Zur Kenntnis der Triterpene (50. Mitteilung). Umwandlung der  $\beta$ -Boswellinsäure in  $\alpha$ -Amyrin. *Helvetica Chimica Acta* 1939; 22: 948-951
144. Safayhi H, Sailer ER, Ammon HPT. 5-Lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-boswellic acid (AKBA) by a novel mechanism. *Phytomedicine* 1996; 3: 71-72
145. Safayhi H, Mack T, Ammon HPT. Protection by boswellic acids against galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochemical Pharmacology* 1991; 41: 1536-1537
146. Safayhi H, Mack T, Sabieraj J, Anazodo MI, Subramanian LR, Ammon HPT. Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1992; 261: 1143-1146
147. Safayhi H, Sailer ER, Ammon HPT. Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-beta-boswellic acid. *Molecular Pharmacology* 1995; 47: 1212-1216
148. Safayhi H, Rall B, Sailer ER, Ammon HPT. Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997; 281: 460-463
149. Safayhi H, Boden SE, Schweizer S, Ammon HPT. Concentration dependent potentiating and inhibitory effects of *Boswellia* extracts on 5-lipoxygenase product formation in stimulated PMNL. *Planta Medica* 2000; 66: 110-113
150. Sailer ER, Hoernlein RF, Subramanian LR, Ammon, HPT, Safayhi H. Preparation of novel analogues of the nonredox-type non-competitive leukotriene biosynthesis inhibitor AKBA. *Archiv der Pharmazie* 1996; 329: 54-55
151. Sailer ER, Subramanian LR, Rall B, Hoernlein RF, Ammon HPT, Safayhi H. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity. *British Journal of Pharmacology* 1996; 117: 615-618
152. Sailer ER, Ammon, HPT, Safayhi H. Identification of a binding site for acetyl- $\beta$ -keto-boswellic acid on human 5-lipoxygenase by photoaffinity labeling. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1997: 355
153. Salzman M. Supratentorial gliomas: Clinical features and surgical therapy. *Neurosurgery* 1996: 777-788
154. Samuelsson B. Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research* 1983; 11: 1-13
155. Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983; 220: 568-575
156. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*, 1987; 237: 1171-1176

157. Sander O, Herborn G, Rau R. Ist H 15 (Harzextrakt von *Boswellia Serrata*, "Weihrauch") eine sinnvolle Ergänzung zur etablierten medikamentösen Therapie der chronischen Polyarthritis? Ergebnisse einer doppelblinden Pilotstudie. *Zeitschrift für Rheumatologie* 1998 ;57: 11-16
158. Sauer R. Radiation Therapy of Brain Tumors. In: Jellinger K (Hrsg.). *Therapy of Malignant Brain Tumors*. Springer Verlag Wien New York 1987
159. Schlegel U, Westphal M, Winking M, Broich K. Klinische Symptomatik und allgemeine Therapie. In: Schlegel U, Weller M, Westphal M (Hrsg.). *Neuroonkologie*. Thieme Verlag Stuttgart New York 2003
160. Schneider E, Hsiang Y. DNA Topoisomerases as Anticancer Drug Targets: DNA gyrase and the supercoiling of DNA. *Advances in Pharmacology* 1990; 21: 149-183
161. Schweizer S, Eichele K, Ammon HPT, Safayhi H. 3-Acetoxy group of genuine AKBA (acetyl-11-keto-beta-boswellic acid) is alpha-configured. *Planta Medica* 2000; 66: 781-782
162. Scott J, Brasher P, Sevic R, Rewcastle N, Forsyth P. How often are nonenhancing supratentorial gliomas malignant? A population study. *Neurology* 2002; 59: 947-949
163. Sehested M, Jensen PB. Mapping of DNA topoisomerase II poisons (etoposide, clerocidin) and catalytic inhibitors (aclerubicin, ICRF-187) to four distinct steps in the topoisomerase II catalytic cycle. *Biochemical Pharmacology* 1996; 51: 879-886
164. Seifert F, Gerhardt, H. Lebensqualität unter antientzündlicher Therapie mit dem *Boswellia-Serrata*-Extrakt H 15. *Die Medizinische Welt* 2001; 52 :3-8
165. Shapiro WR, Green SB, Burger PC. Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. *Journal of Neurosurgery* 1989; 71: 1-9
166. Sharma ML, Khajuria A, Kaul A, Singh S, Singh GB, Atal CK. Effect of salai guggal ex-*Boswellia serrata* on cellular and humoral immune responses and leucocyte migration. *Agents and Actions* 1988; 24: 161-164
167. Sharma ML, Bani S, Singh GB. Anti-arthritic activity of boswellic acids in bovine serum albumin (BSA)-induced arthritis. *International Journal of Immunopharmacology* 1989; 11: 647-652
168. Shaw EG, Dumas-Duport C, Scheithauer BW, Gilbertson DT, O'Fallon JR, Earle JD, Laws ER, Okazaki H. Radiation therapy in the management of low-grade supratentorial astrocytomas. *Journal of Neurosurgery* 1989; 70: 853-861
169. Shimizu T, Takusagawa Y, Izumi T, Ohishi N, Seyama Y. Enzymic synthesis of leukotriene B4 in guinea pig brain. *Journal of Neurochemistry* 1987; 48: 1541-1546
170. Shimizu T. Enzymes functional in the syntheses of leukotrienes and related compounds. *The International Journal of Biochemistry* 1988; 20: 661-666



171. Shimizu T, Watanabe T, Asano T, Seyama Y, Takakura K. Activation of the arachidonate 5-lipoxygenase pathway in the canine basilar artery after experimental subarachnoidal hemorrhage. *Journal of Neurochemistry* 1988; 51: 1126-1131
172. Shu HK, Kim MM, Chen P, Furman F, Julin CM, Israel MA. The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998; 95: 14453-14458
173. Shu S, Chou T, Rosenberg SA. In vitro sensitization and expansion with viable tumor cells and interleukin 2 in the generation of specific therapeutic effector cells. *Journal of Immunology* 1986; 136: 3891-3898
174. Simmet T, Seregi A, Hertting G. Formation of sulphidopeptide-leukotrienes in brain tissue of spontaneously convulsing gerbils. *Neuropharmacology* 1987; 26: 107-110
176. Simmet T, Luck W, Winking M, Delank WK, Peskar BA. Identification and characterization of cysteinyl-leukotriene formation in tissue slices from human intracranial tumors: evidence for their biosynthesis under in vivo conditions. *Journal of Neurochemistry* 1990; 54: 2091-2099
175. Simmet T, Tippler B. On the relation between cerebral cysteinyl-leukotrieneformation and epileptic seizures. *Brain Research* 1991; 540: 283-286
177. Singh GB, Atal CK. Pharmacology of an extract of salai guggal ex-Boswellia serrata, a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Agents and Actions* 1986; 18: 407-412
178. Sirois P, Borgeat P, Rola-Pleszczynski M. Interactions between leukotrienes and another eicosanoids. In: Lefer AM, Gee MH. *Leukotrienes in Cardiovascular and Pulmonary Function*. Alan R. Liss. Inc. New York 1985
179. Spiegel EA, Wycis HT, Thur C. The stereoencephalotome (model III of our stereotaxic apparatus for operations on the human brain). *Journal of Neurosurgery* 1951; 8: 452-453
180. Steiger HJ, Markwalder RV, Seiler RW, Ebeling U, Reulen HJ. Early prognosis of supratentorial grade 2 astrocytomas in adult patients after resection or stereotactic biopsy. An analysis of 50 cases operated on between 1984 and 1988. *Acta Neurochirurgica* 1990; 106: 99-105
181. Strandberg K, Uvnas B. Purification and properties of the slow reacting substance formed in the cat paw perfused with compound 48-80. *Acta Physiologica Scandinavica* 1971; 82: 358-374
182. Streffer JR, Bitzer M, Schabet M, Dichgans J, Weller M. Response of radiochemotherapy associated cerebral edema to a phytotherapeutic agent, H15. *Neurology* 2001; 56: 1219-1221
183. Stryer L. Replikation und Expression der Gene. In: Stryer L. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 1996

184. Sullivan D, Latham M, Ross W. Proliferation-dependent topoisomerase II content as a determinant of antineoplastic drug action in human, mouse, and Chinese hamster ovary cells. *Cancer Research* 1987 ;47: 3973-3979
185. Suzuki N, Nakamura T, Imabayashi S, Ishikawa Y, Sasaki T, Asano T. Identification of 5-hydroxy eicosatetraenoic acid in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurochemistry* 1983; 41: 1186-1189
186. Tagari P, Boullin DJ, Du Boulay GH, Aitken V. Vasoconstrictor and vasodilator effects of leukotriene D4 and FPL 55712 on human and rat cerebral arteries. *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research* 1983; 12: 357-364
187. Tan KB, Dorman TE, Falls KM, Chung TD, Mirabelli CK, Crooke ST, Mao J. Topoisomerase II alpha and topoisomerase II beta genes: characterization and mapping to human chromosomes 17 and 3, respectively. *Cancer Research* 1992; 52: 231-234
188. Taylor D, Tukmachi E. Effect of Leukotriene D4 (LTD4) on resistance of the canine cerebral and cephalic circulation. *The Journal of Physiology* 1986; 377: 17-18
189. Tschirch A, Halbey O. Untersuchungen über die Sekrete. Über das Olibanum. *Archiv der Pharmazie* 1898; 236: 487-503
190. Tschirch A. Die Harze und die Harzbehälter. Bomträger, Leipzig 1900
191. Uhm JH, Dooley NP, Villemure JG, Yong VW. Mechanisms of glioma invasion: role of matrix-metalloproteinases. *The Canadian Journal of Neurological Sciences* 1997; 24: 3-15
192. Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD. Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifuorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1998; 18: 510-520
193. Virchow R. Die krankhaften Geschwülste. Hirschwald, Berlin 1863/65
194. Vohora SB, Shamsi MA, Khan MS. Antipyretic and analgesic studies on the diacetate of a new triterpenic acid isolated from *Corchorus depressus* L. *Journal of Ethnopharmacology* 1981; 4: 223-228
195. von Holst H, Granstrom E, Hammarstrom S, Samuelsson B, Steiner L. Effect of leucotrienes C4, D4, prostacyclin and thromboxane A2 on isolated human cerebral arteries. *Acta Neurochirurgica* 1982; 62: 177-185
196. Wahab SM, Aboutabl EA, El-Zalabani SM, Fouad HA, De Pooter HL, El-Fallaha B. The essential oil of olibanum. *Planta Medica* 1987; 53: 382-384
197. Wang J. DNA Topoisomerases. *Annual review of biochemistry* 1996;65:635-692
198. Wang L, Liu X. Determination of DNA topoisomerase II activity from L1210 cells - a target for screening antitumor agents. *Acta pharmacologica Sinica* 1991; 12: 108-114

199. Weide I, Winking M, Simmet T. Intravascular cysteinyl-leukotriene formation by clotting whole human blood. Evidence from clamped umbilical vein segments and thrombus specimens. *Thrombosis Research* 1993; 72: 83-90
200. Wernicke C, Hahn R. Idiopathischer Abszeß des Occipitallappens, durch Operation entleert. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 1882; 87: 335-344
201. Winking M, Wildförster W. Computer tomographic control of the development of posttraumatic intracranial hematoma. *Neurosurgical Review* 1989; 12 :152-158
202. Winking M, Simmet T, Lausberg G. Nachweis von Cysteinyl-Leukotrienen aus menschlichem Hirntumorgewebe im Urin. In: Firnhaber W, Dworschak K, Lauer K, Nichtweiß M (Hrsg.). *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie*, Vol. 6. Springer Berlin- Heidelberg- New York 1991
203. Winking M, Simmet T. Cysteinyl-leukotrienes production by human astrocytomas in vivo correlates with the malignancy grade and the perifocal edema. In: Nigam S, Honn K, Marnett L. *Eicosanoids and other bioactive lipids in cancer, inflammation and radiation injury*. Kluwer Academic publishers, Boston - Dordrecht –London 1992;4 :28
204. Winking M, Lausberg G, Simmet T. Malignancy dependent Formation of Cysteinyl-Leukotrienes in Human Brain Tumor Tissues and its Detection in Urine. In: Pisco K, Brock M, Klinger M (Hrsg.). *Advances and technical standards in neurosurgery*, Vol. 10. Springer, Berlin- Heidelberg- New York 1992
205. Winking M, Simmet T. Urinary LTE<sub>4</sub> Excretion correlates with the perifocal edema and the malignancy grade in patients with astrocytomas. In: *The 8th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds*. Montreal July 26-31 1992; Abstractbook S. 333
206. Winking M. Computer tomographic assessment of the pre- and postoperative ventricle width in patients with traumatic intracranial haematomas. *Acta Neurochirurgica* 1994; 126: 128-134
207. Winking M, Böker DK, Simmet T. Significant Influence of Cysteinyl-leukotrienes in Formation of Perifocal Edema in Brain Tumor Patients. *Journal of Neuro-Oncology* 1994; 21: 67
208. Winking M, Böker DK. Patient expectations from lumbar intervertebral disk operations-- an analysis of a questionnaire survey of 200 patients. *Zentralblatt für Neurochirurgie* 1994; 55: 179-184
209. Winking M, Böker DK, Simmet T. Cysteinyl-Leukotriensynthese bei Astrocytomen - Korrelation mit dem perifokalen Ödem und Malignitätsgrad. In: Moskopp D, Wassmann H. *Moderne Verfahren zur Optimierung der Hirntumorbehandlung*. Shaker Verlag, Aachen 1995

- 
210. Winking M, Wildförster W, Böker DK. Percutaneous ultrasound-assisted tumor cyst puncture of a recurrent intracerebral brain tumor. *Aktuelle Radiologie* 1995; 5: 181-183
211. Winking M, Heldt RM, Simmet T. Thrombin stimulates activation of the cerebral 5-lipoxygenase pathway during blood-brain cell contact. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1996; 16: 737-745
212. Winking M, Müller HW, Deinsberger W, Jödicke A, Böker DK. Levels of immunoreactive Cysteinyl-Leukotrienes in CSF after subarachnoid haemorrhage correlate with blood flow-velocity in TCD. *Acta Neurochirurgica* 1997; 139: 764-769
213. Winking M, Sarikaya S, Rahmanian A, Jödicke A, Böker DK. Boswellic acids inhibit glioma growth: a new treatment option? *Journal of Neuro-Oncology* 2000; 46: 97-103
214. Winterstein A, Stein G. Untersuchungen in der Saponinreihe X. Zur Kenntnis der Monooxytriterpensäuren. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 1932; 208: 9-25
215. Wolff JE, Denecke J, Jurgens H. Dexamethasone induces partial resistance to cisplatin in C6 glioma cells. *Anticancer Research* 1996; 16: 805-809
216. Zhao W, Entschladen F, Liu H, Niggemann B, Fang Q, Zaenker KS, Han R. Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma cells. *Cancer Detection and Prevention* 2003; 27: 67-75
217. Zülch KJ. Die Hirngeschwülste in biologischer und morphologischer Darstellung. *Joh Ambr Barth, Leipzig* 1956: 31-37
218. Zülch KJ. Neuropathology of intracranial haemorrhage. *Progress in brain research* 1968; 30: 151-165
219. Zülch KJ. Pathology and classification of glioma multiforme. *Acta radiologica: therapy, physics, biology* 1969; 2: 1-84
220. Zülch KJ. Principles of the World Health Organization (WHO) classification of brain tumors. *Neuroradiology* 1980; 19: 59-66
221. Zülch KJ. *Brain Tumors*. 3rd edn., Springer Berlin- Heidelberg- New York 1986

## Lebenslauf

**Persönliche Daten:** Afshin Rahmanian- Schwarz  
geboren am 15.11.1972 in Abadan (Iran)

**Staatsangehörigkeit:** Deutsch

**Familienstand:** verheiratet

### Schule:

09.1979 – 07.1985	Grundschule Alborz ( Iran )
09.1985 – 05.1987	Gymnasium Alborz ( Iran )
01.1988 – 07.1989	Ostschule Gießen
09.1989 – 06.1992	Liebigschule Gießen
Juni 1992	Abitur ( Liebigschule Gießen )

### Studium und Beruf:

10.1993 - 06.2000	Humanmedizinstudium an der Justus – Liebig Universität Gießen
09.1997 - 10.1997	Orthopädische und allgemeinchirurgische Abteilung der MEDICAL UNIVERSITY OF SOUTHERN AFRICA( MedUnSA ) in Pretoria
04.1999 - 08.1999	Praktisches Jahr am Kantonsspital Herisau SCHWEIZ / Schwerpunkt: Allgemeinchirurgie, Unfallchirurgie und Orthopädie
10.2000 - 05.2002	Arzt im Praktikum in der Abteilung für Hand- und Plastisch Chirurgische / St. Joseph Krankenhaus Essen
06.2002 – 08.2006	Assistenzarzt in der Abteilung für Plastische, Rekonstruktive und Ästhetische Chirurgie / Handchirurgie Klinikum Lüdenscheid- Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Bonn
seit 08.2006	Assistenzarzt in der Abteilung für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und Verbrennungschirurgie Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Tübingen (Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls- Universität Tübingen)
seit 2002	Mitglied der VDÄPC und DGH

## **Danksagung**

Mein tiefster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Winking für die Ermöglichung einer interessanten wissenschaftlichen Tätigkeit und für die fachliche Beratung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Böker, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese experimentelle Arbeit an der von ihm geführten Neurochirurgischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen durchzuführen.

Ganz besonders herzlich möchte ich meiner Frau für ihr Verständnis und für ihre liebevolle Unterstützung während der nicht immer einfachen Zeit danken.

Außerdem geht mein Dank an alle, die mir während des Projektes mit Rat und Tat zur Seite standen.